

**Entwicklung und Charakterisierung eines trojanischen**  
***Helicobacter pylori***

Von der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen University  
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigte  
Dissertation

vorgelegt von

Tobias Zumbusch, Master of Science

aus

Euskirchen

Berichter: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Lars Blank  
Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Stefan Schillberg

Tag der mündlichen Prüfung: 10.02.2026

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek online verfügbar.

„What doesn't kill you, mutates and tries again“

*Helicobacter pylori*

### Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all jenen bedanken, die mich fachlich und persönlich unterstützt haben und somit zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Zu Beginn möchte ich mich bei Ihnen Herrn Prof. Dr.-Ing **Lars Blank**, ganz herzlich für die Betreuung meiner Promotion als Erstgutachter bedanken. Weiterhin möchte ich mich herzlichst bei Ihnen für die beratenden Gespräche und die gesamte Unterstützung bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. **Stefan Schillberg** möchte ich mich ebenfalls ganz herzlich für die Möglichkeit bedanken, meine Arbeit am Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie IME zu verfassen sowie für die Unterstützung und Betreuung meiner Promotion als Zweitgutachter.

Dir, Dr. **Florian Schröper**, möchte ich besonders dafür danken, dass ich in Deiner Arbeitsgruppe auf einem solch spannendem Themengebiet arbeiten durfte. Mit diesem Thema hast Du mich begeistern können! Weiterhin möchte ich Dir ganz herzlich dafür danken, dass Du mir immer bei strategischen Fragestellungen weitergeholfen und den spontanen Auslandsaufenthalt ermöglicht hast.

Dir, **Holger Spiegel**, danke ich besonders für Deine fachliche Expertise und Beratung sowie für die lustigen und tiefgründigen Gespräche. Du warst eine große Stütze für meine Arbeit! Ebenso möchte ich mich ebenfalls bei Dir, Dr. **Stefan Rasche**, für die strategische und fachlichen Beratung bedanken. Bei Dir, **Alexander Croon**, möchte ich mich nicht nur für die fachliche analytische Expertise bedanken, welche für die Promotion unerlässlich war, sondern auch dafür, dass Du uns als Bürokollege mit deiner ewigen Quelle an Süßigkeiten versorgt hast. Bei Dr. **Andreas Schiermeyer** bedanke ich mich besonders für die Durchführung der praktischen Arbeit einiger Experimente in meiner Abwesenheit. Du hast mir sehr bei meinen Arbeiten weitergeholfen! Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. **Birgit Orthen** für die freundliche Unterstützung während der Promotion als PhD-Koordinatorin bedanken.

Den **IME Buddies** möchte ich ganz besonders für die unvergessliche Zeit danken sowie für die lustigen Gespräche während der Kaffee- und Mittagspausen und die gemeinsamen Ausflüge. Vielen Dank an Maria Stroot, Larissa Terkatz, Carlos Helbig, Mike Lutz, Julia Niehues, Maurice Mürköster, Annika Mutz, Saskia Triller, Anne Marczewski und an meinen Labor Buddy seit Beginn des Studiums, Rebecca Zirbes. Bei Dir, Carlos, möchte ich mich an dieser Stelle besonders für die freundliche Bereitstellung deines Python-Scripts bedanken.

Weiterhin möchte ich mich ebenfalls besonders bei Prof. Dr. **Silja Wessler** dafür bedanken, dass ich spontan in Deiner Arbeitsgruppe Experimente für meine Promotion durchführen konnte. Ebenfalls möchte ich mich bei Dir, Silja, und Dir, Dr. **Gernot Posselt**, dafür bedanken,

dass Ihr mich umfangreich bei *H. pylori*-spezifischen Fragestellungen beraten habt. Weiterhin möchte ich mich bei Dr. **Marina Cañadas Ortega** bedanken, dass Du die Zellen für meine Experimente vorbereitet hast und mir die Salzburger Umgebung gezeigt hast. Euer humanes mukogenes Magenschleimhaut-Modell hat mich begeistert!

Bei Dir, Dr. **Aleksandra Debowski**, möchte ich mich besonders bedanken. Du warst für mich während der Promotion die erste *H. pylori*-Fachexpertin, die mich freundlicherweise bei vielen *H. pylori*-spezifischen Fragestellungen beraten hat. Mit Deinem Plasmid-System konnte ich meine Arbeiten umsetzen. Vielen lieben Dank dafür!

**Nina Bischhaus**, du hast mich seit Beginn der Promotion unterstützt und standest mir immer bei allen Höhen und Tiefen zur Seite. Bei Dir möchte ich mich besonders für deine liebevolle Unterstützung bedanken. Ich liebe dich!

Zum Schluss möchte ich meiner gesamten Familie danken: Bei meiner Mutter, **Karin Zumbusch**, meinem Vater, **Ulrich Zumbusch**, meinem Bruder, **Philipp Zumbusch** und meiner Schwägerin, **Katja Zumbusch**. Vielen Dank für die gesamte Unterstützung und die schönen Momente.

**Eidesstattliche Erklärung**

Ich, Tobias Zumbusch, erkläre hiermit, dass diese Dissertation und die darin dargestellten Inhalte die eigenen sind und selbstständig, als Ergebnis der eigenen originären Forschung, generiert wurden.

Hiermit erkläre ich an Eides statt

1. Diese Arbeit wurde vollständig oder größtenteils in der Phase als Doktorand dieser Fakultät und Universität angefertigt;
2. Sofern irgendein Bestandteil dieser Dissertation zuvor für einen akademischen Abschluss oder eine andere Qualifikation an dieser oder einer anderen Institution verwendet wurde, wurde dies klar angezeigt;
3. Wenn immer andere eigene- oder Veröffentlichungen Dritter herangezogen wurden, wurden diese klar benannt;
4. Wenn aus anderen eigenen- oder Veröffentlichungen Dritter zitiert wurde, wurde stets die Quelle hierfür angegeben. Diese Dissertation ist vollständig meine eigene Arbeit, mit der Ausnahme solcher Zitate;
5. Alle wesentlichen Quellen von Unterstützung wurden benannt;
6. Wenn immer ein Teil dieser Dissertation auf der Zusammenarbeit mit anderen basiert, wurde von mir klar gekennzeichnet, was von anderen und was von mir selbst erarbeitet wurde;
7. Kein Teil dieser Arbeit wurde vor deren Einreichung veröffentlicht.

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift

### Zusammenfassung

Das Humanpathogen *Helicobacter pylori* kolonisiert den menschlichen Magen und ist an der Entstehung von Magengeschwüren und -krebs beteiligt. Mehr als die Hälfte der Weltbevölkerung ist bereits mit dem Bakterium infiziert. Der Erreger ist gut an das Milieu im Magen angepasst und in Abhängigkeit von verschiedenen individuellen Faktoren wie Mikrobiom und Immunstatus lassen sich verschiedene Krankheitsverläufe beobachten. Aktuelle Therapien erfolgen ausschließlich auf Basis von Antibiotika. Resistenzen gegenüber den verfügbaren, Therapie-relevanten Antibiotika erschweren jedoch zunehmend eine effektive Behandlung von Patienten. Daher werden langfristig alternative Therapie-Ansätze benötigt, um die Antibiotika z.B. durch antimikrobielle Peptide (AMPs) zu ergänzen bzw. zu ersetzen.

Um zukünftig eine effektive Antibiotika-freie Eradizierung von *H. pylori* zu ermöglichen, wurde die Wirksamkeit von 13 AMPs gegenüber *H. pylori* untersucht. Hierbei erwiesen sich die Peptide LL-37 und Nisin A als die wirksamsten Kandidaten. Im Rahmen von Dosis-Wirksamkeitskurven wurde für beide Peptide eine mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) von  $\sim 12 \mu M$  für LL-37 und  $\sim 11 \mu M$  für Nisin A berechnet. Weiterhin wurden alle AMPs hinsichtlich ihrer zytotoxischen und hämolytischen Aktivität sowie ihrer Sensitivität gegenüber dem im menschlichen Magen vorliegenden Verdauungsenzym Pepsin analysiert. Um den Wirkstoff zum Ort der Infektion zu bringen, sollte ein modifizierter *H. pylori*-Stamm entwickelt werden. Dieser soll als trojanisches Pferd fungieren und sich in unmittelbarer Nähe zum Pathogen ansiedeln, um dort den Wirkstoff bei Kontakt mit pathogenen *H. pylori*-Zellen zielgerichtet freizusetzen. Dazu soll die Synthese und Sekretion des Wirkstoffs durch Botenstoffe, sogenannte Autoinducer (AI), angeregt werden, die vom pathogenen *H. pylori* freigesetzt werden. LC-MS/MS Analysen zeigten, dass *H. pylori* AI-2 als Botenstoff synthetisiert, nicht aber AI-1 oder AI-3. Die Attenuierung eines pathogenen *H. pylori*-Stamms sollte durch Deletionen von Pathogenitätsfaktoren erreicht werden. Dazu wurden drei Gen-Loci deletiert, welche für die Pathogenitätsfaktoren VacA und IceA2 sowie das Enzym LuxS codieren, das an der Katalyse eines bakteriellen Botenstoffs beteiligt ist. Eine Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie bestätigt das Ausbleiben der Bildung des VacA-Proteins und eine LC-MS/MS-Analytik eine signifikante Reduktion der Synthese des bakteriellen Botenstoffs AI-2. Die Bestätigung der *iceA2*-Deletion erfolgte mittels Sequenzierung. Vergleichende *in vitro* Infektionsversuche von humanen Magenschleimhautzellen erfolgten aus Zeit- und Kostengründen mit der Trojanergeneration *H. pylori* HP4 und zeigten wie angestrebt keine deutliche Reduktion der

Kolonisierungseffizienz des Trojaners HP4 im Vergleich zum Wildtyp. Allerdings fiel auch der dabei ausgelöste Zytokin-Titer (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ ) ähnlich aus, was darauf hindeutet, dass die Trojanergeneration HP4 noch nicht ausreichend attenuiert ist und weiter optimiert werden muss. Daher wurde nachfolgend zusätzlich das für den Hauptpathogenitätsfaktor CagA codierende *cagA*-Gen deletiert und der Stamm *H. pylori* HP5 generiert. Ein Western-Blot Analyse bestätigte, dass der erzeugte Trojaner HP5 das CagA-Protein nicht mehr bildet. Zukünftige Studien werden klären müssen, ob hierdurch eine signifikante Reduktion der Pathogenitätparameter (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ ) erreicht werden kann, oder ob hierfür weitere Deletionen erfolgen müssen.

**Abstract**

The human pathogen *Helicobacter pylori* is a bacterium that colonizes the human stomach and is involved in the development of stomach ulcers and cancer. More than half of the world's population is already infected with *H. pylori*. The pathogen is well adapted to the environment in the stomach and different courses of disease can be observed depending on various individual factors such as microbiome and immune status. Current therapies rely solely on antibiotics. However, resistance to therapy-relevant antibiotics makes it difficult to treat patients effectively, which is why alternative antibiotic-free therapy approaches are needed in the long term to supplement or replace antibiotics, such as with antimicrobial peptides (AMPs).

To enable effective antibiotic-free eradication of *H. pylori* in the future, the efficacy of 13 AMPs against *H. pylori* was investigated. The peptides LL-37 and Nisin A were found to be the most effective candidates. By recording dose-response curves, an almost similar mean inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) in the lower micromolar concentration range was determined for LL-37 (~12 µM) and Nisin A (~11 µM). Furthermore, all AMPs were analyzed with regard to their cytotoxic and hemolytic activity as well as their sensitivity to the digestive enzyme pepsin present in the human stomach. To deliver the drug to the site of infection, a modified *H. pylori* strain was to be developed that can act as a Trojan horse and colonize in the immediate vicinity of the pathogen in order to release the active substance in a targeted manner upon contact with pathogenic *H. pylori* cells. To this end, the synthesis and secretion of the active ingredient is to be induced by messenger substances known as autoinducers (AI) released by the pathogenic *H. pylori*. LC-MS/MS analyses revealed that *H. pylori* synthesizes AI-2 as a messenger substance, but not AI-1 or AI-3. The attenuation of a pathogenic *H. pylori* strain should be achieved by deleting pathogenicity factors. For this purpose, three gene loci, two of which encode for the pathogenicity factors VacA and IceA2 and one for the enzyme LuxS, which is involved in the catalysis of a bacterial messenger substance, were deleted. A surface plasmon resonance spectroscopy confirmed the absence of VacA protein formation and LC-MS/MS analysis confirmed a significant reduction in the synthesis of the bacterial messenger substance AI-2. *iceA2* deletion was confirmed by sequencing. Comparative *in vitro* infection experiments of human gastric mucosal cells were carried out with the Trojan generation *H. pylori* HP4 for reasons of time and cost. As intended, these showed no significant reduction in colonization efficiency of the Trojan HP4 compared to the wild type. However, the triggered cytokine titers (IL-1β, IL-6, IL-8, IFN-γ und TNF-α) were similar, indicating that this Trojan generation is not yet sufficiently attenuated and needs to be further optimized. Therefore, the *cagA* gene coding

for the main pathogenicity factor CagA was subsequently deleted and the strain *H. pylori* HP5 was generated. A western blot analysis confirmed that the generated Trojan HP5 no longer produces the CagA protein. Future studies will have to clarify whether this leads to a significant reduction in the pathogenicity parameters (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ ) or whether further deletions are required.

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Abstract.....	III
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Humanpathogen <i>Helicobacter pylori</i> .....	1
1.2 Virulenzfaktoren.....	1
1.2.1 Urease.....	2
1.2.2 Flagellen.....	2
1.2.3 Adhäsine.....	2
1.2.4 Die Zytotoxin-assoziierte Gene-Pathogenitätsinsel.....	3
1.2.5 Zytotoxin-assoziiertes Gen A.....	3
1.2.6 Vakuolisierendes Zytotoxin A.....	4
1.2.7 <i>Induced By Contact With Epithelium</i> .....	5
1.3 <i>Quorum Sensing</i> .....	5
1.4 Aktuelle Eradikationsstrategien.....	6
1.5 Alternative und neuartige Eradikationsstrategien.....	7
1.5.1 Vakzinierung.....	7
1.5.2 Antimikrobielle Peptide .....	8
1.5.3 Bakterielle <i>Drug-Delivery</i> Systeme .....	8
1.6 Zielsetzung .....	10
<b>2 Material &amp; Methoden .....</b>	<b>12</b>
2.1 Material.....	12
2.1.1 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial.....	12
2.1.2 Bakterienstämme und Zelllinien .....	12
2.1.3 Antimikrobielle Peptide .....	13
2.1.4 Primer.....	14
2.1.5 Plasmide .....	15
2.2 Methoden.....	17
2.2.1 Bakterielle Kultivierung.....	17
2.2.1.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	17
2.2.1.2 Erstellung einer <i>H. pylori</i> Zellbank.....	18
2.2.1.3 Kultivierung von <i>H. pylori</i> .....	19
2.2.1.4 AMP-Wirksamkeitstest im BioLector® Pro .....	19
2.2.1.5 Aufnahme von Dosis-Wirksamkeitskurven .....	21
2.2.2 Zellkultur – Kultivierung und Assays .....	22
2.2.2.1 Kultivierung von AGS-Zellen.....	22
2.2.2.2 Zytotoxizitätstest.....	23
2.2.2.3 Passagierung und Kultivierung von mukogenen Magenschleimhautzellen .....	24
2.2.2.4 Infektion von humanen mukogenen Magenschleimhautzellen .....	26
2.2.2.5 Isolierung humaner Erythrozyten.....	27
2.2.2.6 Bestimmung der hämolytischen Aktivität der AMPs.....	27
2.2.3 Molekulare Methoden .....	28
2.2.3.1 Isolierung von DNA.....	28
2.2.3.2 Isolierung von RNA .....	29
2.2.3.3 Quantifizierung von DNA- und RNA-Proben.....	29
2.2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion .....	29
2.2.3.5 Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion .....	30
2.2.3.6 Restriktion von DNA .....	31
2.2.3.7 Agarose-Gelelektrophorese.....	32
2.2.3.8 Klonierung .....	32

2.2.3.9 Sequenzierung.....	33
2.2.3.10 Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i> .....	33
2.2.3.11 Transformation und Genom-Editierung von <i>H. pylori</i> .....	33
2.2.3.12 Isolierung von Gesamtzellproteinen.....	34
2.2.3.13 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	35
2.2.3.14 Western-Blot.....	35
2.2.3.15 Zytokin-Quantifizierung .....	36
2.2.3.16 SPR-Spektroskopie .....	36
2.2.4 Extraktions- und Chromatographie-Methoden.....	38
2.2.4.1 Extraktion von AI-1 aus Kulturüberständen .....	38
2.2.4.2 Extraktion und Derivatisierung von AI-2 aus Kulturüberständen.....	39
2.2.4.3 Extraktion von AI-3 aus Kulturüberständen .....	41
2.2.4.4 Qualitativer Nachweis von AI-1 mittels LC-MS/MS.....	42
2.2.4.5 Quantifizierung von AI-2 mittels LC-MS/MS .....	43
2.2.4.6 Qualitativer Nachweis von AI-3 mittels LC-MS/MS.....	45
2.2.4.7 Enzymatische Hydrolyse der AMPs .....	46
2.2.5 Daten Evaluation und Visualisierung.....	48
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
3.1 Identifizierung wirksamer AMPs .....	49
3.1.1 Wirksamkeitstests der AMPs gegenüber <i>H. pylori</i> im BioLector-System .....	49
3.1.2 Aufnahme von Dosis-Wirksamkeitskurven für LL-37 und Nisin A .....	52
3.1.3 Zytotoxische Aktivität der AMPs gegenüber einer AGS-Zelllinie .....	54
3.1.4 Hämolytische Aktivität der AMPs gegenüber humanen Erythrozyten.....	55
3.1.5 Pepsin Hydrolyse der AMPs .....	57
3.2 Screening nach gebildeten AI-Typen durch <i>H. pylori</i> .....	61
3.2.1 Untersuchung auf Bildung von AI-1 .....	61
3.2.2 Untersuchung der Bildung von AI-3 .....	63
3.3 Generierung eines trojanischen <i>H. pylori</i> .....	64
3.3.1 Klonierung von Deletionsplasmiden .....	64
3.3.2 Erzeugung von Modifikationen und Deletionen in <i>H. pylori</i> .....	65
3.3.3 Quantifizierung der AI-2-Konzentration.....	67
3.3.4 SPR-basierter Nachweis des VacA-Proteins .....	69
3.3.5 Untersuchung des <i>iceA2</i> Knockout-Stamms mittels Sequenzierung.....	71
3.3.6 Kolonisierungseffizienz des Trojaners HP4 .....	73
3.3.7 Immunantwort des Trojaners HP4.....	74
3.3.8 CagA-Immunodetektion.....	75
3.4 Schlussfolgerung Ergebnisse .....	77
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>78</b>
4.1 Screening nach wirksamen AMPs .....	78
4.2 Untersuchung auf Bildung verschiedener AI-Typen .....	84
4.3 Von der Mythologie zur Forschung: Entwicklung eines trojanischen <i>H. pylori</i> .....	87
4.3.1 Erzeugung von Deletionen und Charakterisierung der Knockout-Stämme.....	87
4.3.2 Trojaner vs. Wildtyp: Analyse der Immunogenität und Kolonisierungseffizienz .....	90
4.3.3 Optimierung des Trojaners.....	92
<b>5 Fazit und Ausblick.....</b>	<b>95</b>
<b>6 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>97</b>
<b>7 Anhang .....</b>	<b>108</b>
7.1 BioLector Wachstumskinetiken.....	108
7.2 Weitere AI-3 Chromatogramme .....	110
7.3 Abkürzungsverzeichnis .....	116

7.4	Abbildungsverzeichnis .....	117
7.5	Tabellenverzeichnis .....	117
7.6	Primer .....	118
7.7	Agar und Medien .....	119
7.8	Puffer, Lösungen, Peptide und Autoinducer-Standards.....	121
7.9	Antikörper, Chemikalien und Zellkulturbestandteile.....	125
7.10	Verbrauchsmaterialien und Kits .....	126
7.11	Geräte und Software .....	128

### 1 Einleitung

#### 1.1 Das Humanpathogen *Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori* ist ein humanadaptiertes Gram-negatives, spiralförmiges, begeißeltes mikroaerophiles Bakterium [1] und wurde erstmalig durch Marshall und Warren 1982 aus Magenbiopsien von Patienten mit chronischer Gastritis, Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren nachgewiesen [2]. Es wird allgemein angenommen, dass schätzungsweise 50 % der weltweiten Bevölkerung mit diesem Pathogen infiziert sind, wobei die globale Prävalenz zwischen 18,9 % und 87,7 % schwankt [3]. Variationen in der Prävalenz sind dabei abhängig von ethnischer Zugehörigkeit, geographischen Gegebenheiten und dem sozioökonomischen Status [3]. Das Bakterium kann über den gastro-oralen, oral-oralen oder fäkal-oralen Weg übertragen werden sowie über kontaminierte Nahrungsmittel und Wasser [4]. Eine Erstinfektion erfolgt überwiegend im Kindesalter und kann mehrere Jahre und sogar lebenslang persistieren. In der Regel verläuft eine Infektion jedoch symptomlos. *H. pylori* ist in der Lage, trotz der extremen Konditionen den menschlichen Magen zu kolonisieren, indem es schnell die Mukosa-Barriere penetriert und sich an der Oberfläche der Magenschleimhaut ansiedelt, wo ein neutraler pH-Wert vorliegt. Dort ist das Bakterium an der Ausbildung der chronischen Gastritis, Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren sowie von Lymphomen der Schleimhaut-assoziierten lymphoiden Gewebe (MALT) und Adenokarzinomen des Magens maßgeblich beteiligt [5]. Magenkrebs stellt laut Ergebnissen der World Health Organization weltweit die vierthäufigste krebsbedingte Todesursache dar [6].

#### 1.2 Virulenzfaktoren

Nachdem *H. pylori* im Zuge einer Infektion in den Magen gelangt, ist das Bakterium bestrebt, dem Säurestress in Richtung einer moderateren Umgebung zu entfliehen. Mithilfe seiner Flagellen bewegt sich das Bakterium entlang eines Urea-Gradienten in Richtung der Magenschleimhautepithelzellen, welcher mittels Chemorezeptoren detektiert wird, um letztlich eine Epithelnische ausfindig zu machen [7]. Mit Hilfe des Enzyms Urease wird dabei das saure Milieu des Magens neutralisiert [8]. Für eine anschließende Adhäsion und Kolonisierung wird ein breites Spektrum an Adhäsinen und *Outer Membrane Proteins* eingesetzt (1.2.3). Eine anschließende Injektion des Proteins Zytotoxin-assoziiertes Gen A (CagA) und Sekretion des vakuolisierenden Zytotoxins (VacA) lösen eine Modulation und Beschädigung der Epithelzellen sowie einen Inflamationsprozess aus [9-13]. Um das saure Milieu des Magenbereichs zu überwinden und um eine persistente Kolonisierung zu etablieren, verfügt

*H. pylori* über ein breites Arsenal an Virulenzfaktoren, wovon einige in den nachfolgenden Kapiteln näher erläutert werden.

### 1.2.1 Urease

Die Urease von *H. pylori* ist ein Nickel-abhängiges Enzym, welches die Hydrolyse von Urea in Ammoniak und Carbamate katalysiert, wobei letzteres sich in Ammoniak und Kohlensäure zersetzt. Dies ermöglicht *H. pylori* lokal die Neutralisierung des sauren Milieus im Magenbereich, die Aufrechterhaltung des periplasmatischen pH-Werts [8] und der protonenmotorischen Kraft, wodurch die energiereichen Metabolite ATP gebildet werden können [14]. Es handelt sich um einen essenziellen Faktor für die Kolonisierung der humanen Magenschleimhaut, da Urease-negative Stämme *in vivo* eine deutlich reduzierte Kolonisierungseffizienz zeigen [15, 16]. Weiterhin ist das Enzym notwendig, damit *H. pylori* eine persistente Infektion etablieren kann [17]. Der Anteil von ca. 10 % am Proteom unterstreicht die Relevanz des Enzyms für *H. pylori* [18]. Darüber hinaus kann das Enzym Monozyten stimulieren, welche proinflammatorische Zytokine freisetzen [19].

### 1.2.2 Flagellen

*H. pylori* besitzt 2–6 ummantelte lophotriche Flagellen [20, 21], welche jeweils aus einem Komplex aus mehr als 20 Proteinen bestehen. Die Beweglichkeit der Flagellen hängt dabei von der protonenmotorischen Kraft ab, wobei die Chemotaxis durch Urea beeinflusst wird [22]. Nicht motile begeißelte Bakterien zeigen eine reduzierte Fähigkeit *in vivo* Mäuse zu infizieren [23]. Weiterhin wurde beobachtet, dass Flagellen einen wesentlichen Bestandteil des Biofilms darstellen und Stämme ohne Flagellen einen weniger robusten Biofilm *in vivo* ausbilden [24]. Die Motilität ist essenziell für eine initiale Kolonisierung und für die Erreichung einer vollen Infektionsstärke [23].

### 1.2.3 Adhäsine

Im Genom von *H. pylori* sind verschiedene *Outer Membrane Proteins* codiert, welche an der Adhärenz und inflammatorischen Prozessen beteiligt sind. Zu diesen Adhäsinen zählen unter anderem die folgenden Proteine: *Outer Inflammatory Protein A* (OipA), *Blood Group Antigen-Binding Adhesion* (BabA), *Sialic Acid-Binding Adhesion* (SabA), *Adherence-Associated Lipoprotein A and B* (AlpA / AlpB) und das *Outer Membrane Protein Q* (HopQ). Entsprechend funktionale Loci sind assoziiert mit einer hohen *H. pylori* Infektionsdichte, einem erhöhten

inflammatorischen Zytokin-Titer und einem schwereren klinischen Verlauf [25-30]. Der Knockout einiger dieser *Outer Membrane Proteins* führt größtenteils zu einem reduzierten Titer proinflammatorischer Zytokine und/oder einer reduzierten Adhärenz [26, 29-34]. Im Gegensatz dazu zeigen OipA-defiziente Stämme einen erhöhten apoptotischen Effekt [34, 35] und AlpA- und AlpB-defiziente Stämme führen *in vivo* zu einer stärkeren Inflammation [36].

### 1.2.4 Die Zytotoxin-assoziierte Gene-Pathogenitätsinsel

Maßgeblich für den Schweregrad der Pathogenese ist die Anzahl entsprechender Pathogenitätsfaktoren sowie die Prädisposition des Wirts. Generell lassen sich *H. pylori*-Stämme in den hoch virulenten Typ-I Stamm gliedern, welche über die Zytotoxin-assoziierte Gene-Pathogenitätsinsel (*cagPAI*) verfügen sowie *cagA*<sup>+</sup> und *vacA*<sup>+</sup> sind, und in den weniger virulenten Typ-II Stamm, welche die *cagPAI* nicht besitzen und kein funktionales VacA ausbilden [37]. Die ca. 40 kb große *cagPAI* beinhaltet ca. 30 *Open Reading Frames*, die für unterschiedliche strukturelle Proteine des Typ IV Sekretionssystems (T4SS) sowie für das Effektorprotein CagA codieren [38]. Das T4SS besteht aus einem Kernkomplex von fünf Proteinen in der äußeren Membran [39], einem extrazellulären Pilus sowie aus Kernkomplex- und Translokations-assoziierten Faktoren, verankert in der inneren Membran, lytischen Transglykolasen und aus einem Nukleosidtriphosphat-hydrolysierenden Proteinkomplex [38]. Die Ausbildung des Pilus erfolgt an der basolateralen Oberfläche der Epithelzelle, dessen Zugang durch die sekretierte Protease *High Temperature Requirement A* (HtrA) ermöglicht wird, welche bestehende Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle hydrolysiert [40]. Die HtrA ist nicht in der *cagPAI* codiert. Das Typ IV Sekretionssystem transloziert neben CagA auch das Lipopolysaccharid Biosynthese Intermediat ADP-Heptose und chromosomale DNA über den Pilus in die Epithelzellen [41-43], wobei ADP-Heptose hauptsächlich die Synthese und Sekretion verschiedener proinflammatorischer Zytokine induziert [41].

### 1.2.5 Zytotoxin-assoziiertes Gen A

Einer der wichtigsten Hauptpathogenitätsfaktoren von *H. pylori* stellt das Zytotoxin-assoziierte Gen A (*cagA*) dar, welches in der *cagPAI* codiert ist. Die Größe des CagA-Proteins variiert zwischen 120 und 145 kDa und lässt sich unter *H. pylori*-Stämmen in einen N-terminalen relativ konservierten Bereich (ca. 70 % des Proteins) und in einen variablen C-terminalen Bereich gliedern (ca. 30 % des Proteins) [44]. Der C-terminale Bereich beinhaltet eine unterschiedliche Anzahl an Motiven, welche aus der Aminosäuresequenz Glutamat-Prolin-Isoleucin-Tyrosin-

Alanin (EPIYA) bestehen [45]. Das CagA-Protein wird über einen Pilus des T4SS in die Wirtszelle injiziert [43] und durch die wirtseigenen Tyrosin-Kinasen Src und c-Abl an entsprechenden EPIYA-Motiven phosphoryliert [45, 46]. Dies führt zur Beeinflussung wirtseigener nachgeschalteter Signalwege [47], was zu Umstrukturierungen des Aktin-Zytoskeletts sowie zur Ausbildung eines verlängerten Zelltyps führt, der als „Hummingbird“-Phänotyp bezeichnet wird [9]. Weiterhin ist CagA an der Freisetzung bestimmter proinflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-8 beteiligt, allerdings indirekt über einen noch unbekanntem Mechanismus [48]. Darüber hinaus wurden bereits Mitte der 1990er Jahre CagA<sup>+</sup>-Stämme in Assoziation mit einem erhöhten Magenkrebs Risiko gebracht [49], was durch weitere *in vivo* Untersuchungen bestätigt wurde [50, 51]. CagA<sup>-</sup>-Stämme zeigen eine signifikant reduzierte Expression von Flagellin A und Flagellin B und einen nicht-motilen Phänotyp [52].

### 1.2.6 Vakuolisierendes Zytotoxin A

Ein weiterer Hauptpathogenitätsfaktor von *H. pylori* stellt das vakuolisierende Zytotoxin (VacA) dar, welches *in vitro* erstmalig durch die Ausbildung von Vakuolen bei Zellkulturen beschrieben wurde [53]. Das *vacA*-Gen codiert für ein Protoxin mit einer Masse von ca. 140 kDa, welches durch eine Sec-abhängige proteolytisch Prozessierung in das mature Toxin mit einer Masse von ca. 88 kDa überführt wird [54]. Bei der Prozessierung entsteht unter anderem ein Protein, welches als Autotransporter in der äußeren Zellmembran für den Transport des VacA-Proteins fungiert [54, 55]. Das aktive monomere Toxin wird aus dem periplasmatischen Raum durch die äußere Zellmembran transloziert [54, 56] und anschließend freigesetzt oder verbleibt als aktives Toxin auf der Zelloberfläche gebunden [57]. Das aktive 88 kDa Protein kann nach der Sekretion zudem in eine 33 kDa N-terminale Domäne (p33) und in eine 55 kDa C-terminale Domäne (p55) prozessiert werden [58]. Sekretiertes VacA oligomerisiert hauptsächlich zu doppelschichtigen Oligomeren, wohingegen membrangebundenes VacA oftmals Hexamere Oligomere ausbildet [59]. Integriert aktives VacA in eine planare Lipiddoppelschicht, wird ein Anionen-selektiver Kanal ausgebildet [12]. Durch die Perforation entsteht eine osmotische Schwellung der späten Endosomen, was letztendlich zur Zellvakuolisierung führt [12]. Darüber hinaus kann VacA weitere zelluläre Veränderungen herbeiführen wie die Inaktivierung des Energiemetabolismus der Mitochondrien [13], und Autophagie [60]. Weiterhin besitzt VacA eine immunmodulatorische Funktion, indem es die Proliferation von T-Zellen [61] und die Antigenpräsentation von B-Zellen inhibiert [62], wodurch die Etablierung einer persistenten Infektion begünstigt wird. Eine mögliche Funktion der VacA-verursachten Porenbildung in Zellmembranen besteht möglicherweise darin,

Nährstoffe aus umgebenden Zellen freizusetzen, um das eigene Wachstum zu fördern [63]. Die Deletion bestimmter Sequenzen innerhalb der p37 Domäne des *vacA*-Locus oder die Substitution spezifischer Aminosäuren innerhalb bestimmter Transmembran-assoziiierter Motive führen zur Inhibierung der Kanalaktivität sowie zum Verlust der vakuolisierenden Aktivität [12, 64].

### **1.2.7 Induced By Contact With Epithelium**

Das Virulenzgen *Induced By Contact With Epithelium* (*iceA*) hat zwei Allele, *iceA1* und *iceA2* [65]. Die Expression von *iceA1* wird durch den Kontakt zwischen *H. pylori* und humanen Epithelzellen hochreguliert [65]. Das IceA1-Protein zeigt Endonuklease-Aktivität [66] und steht in Assoziation mit der Ausbildung von Magengeschwüren [67, 68]. Die Korrelation zwischen den jeweiligen Allelen mit dem klinischen Verlauf ist jedoch umstritten [69-71]. Eine strukturelle Charakterisierung von IceA2 existiert bereits [72], jedoch ist dessen Funktion aktuell unbekannt. Der Nachweis von Antikörpern gegen IceA2 in Serum-Proben von einigen infizierten Patienten deutet darauf hin, dass dieses Protein während der Infektion exprimiert wird [73].

### **1.3 Quorum Sensing**

Bei *Quorum Sensing* handelt es sich um einen bakteriellen Zell-Zell-Kommunikationsprozess, der eine kollektive Verhaltensanpassung als Antwort auf eine Änderung der Zellpopulationsdichte und der Artenzusammensetzung ermöglicht [74]. Hierbei akkumulieren während der Wachstumsphase chemische Botenstoffe, sogenannte Autoinducer (AI), welche von den Zellen als amphiphile Moleküle beständig in ihre Umgebung freigesetzt werden. Ausgeschüttete AI können von Zellen aufgenommen werden, sorgen für eine konzentrationsabhängige Signalübertragung und globale Anpassung der Genexpression wie z.B. für Prozesse der Biolumineszenz, Ausbildung von Biofilmen, Sporulation und Sekretion von Pathogenitätsfaktoren [74, 75]. Hierbei ermöglicht *Quorum Sensing* eine kontrollierte kollektive Prozesskoordination, was den Zellen einen Produktivitätsvorteil bietet [75]. Hauptsächlich unterscheidet man zwischen vier Arten von Autoinducern: *N*-Acyl-L-Homoserinlactone (AI-1), Furanosylboratdiester (AI-2), Pyrazinon-Derivate (AI-3) und Autoinducer Peptide (AIP), wobei letztere hauptsächlich durch Gram-positive Bakterien gebildet werden. Die Biosynthese von AI-3 durch Gram-negative pathogene Bakterien wie z.B. durch enterohämorrhagische *Escherichia coli*-Stämme [76] und *Vibrio cholerae* wurde bereits

beschrieben [77]. Nach aktuellem Stand der Literatur ist die Bildung von AI-1, AI-3 und AIP durch *H. pylori* nicht beschrieben. Weiterhin wurden keine orthologen Gene im Genom von *H. pylori* für die Bildung von AI-1 identifiziert [78]. Allerdings bildet *H. pylori* AI-2, dessen Synthese durch das Enzym *S*-Ribosylhomocysteinase (LuxS) katalysiert wird [78]. LuxS überführt dabei *S*-Ribosylhomocystein in Homocystein und in die AI-2 Vorstufe 4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion (DPD), wobei DPD durch anschließende Dehydratisierung und Zyklisierung in komplexen Gleichgewichtsreaktionen in einen AI-2 Pool überführt wird [79]. Die Synthese von AI-2 beeinflusst die Chemotaxis von *H. pylori* negativ [80]. So bilden LuxS<sup>-</sup> *H. pylori*-Stämme gegenüber dem Wildtyp einen homogeneren Biofilm mit einem höheren prozentualen Anteil an adhärenenten als planktonischen Zellen sowie vermehrte Mikrokolonien auf Epithelzellen aus [81]. Die AI-2 Chemotaxis beeinflusst somit die räumliche Organisation und Ausbreitung des Biofilms [81]. Weiterhin zeigen LuxS<sup>-</sup> *H. pylori*-Stämme keinen signifikanten Kolonisierungsdefekt bei Mausinfektionsversuchen [82]. Ein Knockout des *luxS*-Locus kann in einem kompetitiven Nachteil bei der Kolonisierung von Mäusen mit einem anderen *H. pylori*-Stamm resultieren [83]. Allerdings ist dieser Effekt Stamm-abhängig [83].

### 1.4 Aktuelle Eradikationsstrategien

Aktuell erfolgt eine Therapie von *H. pylori* ausschließlich auf Basis von Antibiotika in Kombination mit einem Protonenpumpeninhibitor. Der Inhibitor reduziert die Magensäureproduktion, wodurch die Wirkung der Antibiotika verbessert wird. Zu den Antibiotika zählen Clarithromycin, Amoxicillin, Tetracyclin, Rifabutin, Metronidazol und Nitroimidazole, wobei diese in unterschiedlichen Kombinationen als Therapieform eingesetzt werden, unter anderem auch in Kombination mit Bismut als Zusatz [84]. Die Auswahl und der Erfolg einer Eradikation richtet sich dabei nach der Sensibilität der Bakterien gegenüber den therapierelevanten Antibiotika sowie nach der Behandlungsdauer, Antibiotika-Allergien und der Behandlungstreue der Patienten.

Laut World Health Organization gehört die antimikrobielle Resistenz zu den zehn größten globalen Gesundheitsbedrohungen [85]. Nach Schätzungen könnte eine fortschreitende Resistenzentwicklung dazu führen, dass bis 2050 ca. 10 Millionen Menschen global pro Jahr aufgrund antimikrobiell resistenter Bakterien sterben [86]. Alleine in Deutschland stieg im Zeitraum 2001–2012 die Primärresistenz gegenüber dem *H. pylori* therapierelevanten Antibiotikum Metronidazol von ca. 22 % auf 36 % an [87]. Eine retrospektive chinesische Studie mit ca. 2900 Patienten zeigte, dass über einen Zeitraum von acht Jahren die Resistenzprofile gegenüber den therapierelevanten Antibiotika Amoxicillin, Chlarithromycin

und Levofloxacin mit einer Mono-Resistenz bei ca. 30 %, die Doppel-Resistenz bei ca. 26 % und bei einer Trippel-Resistenz bei ca. 7 % lag [88]. Eine weitere Studie mit ca. 900 Patienten aus westlichen Ländern zeigte eine Resistenz von ca. 22 % gegenüber Chlarithromycin und 69 % gegenüber Metronidazol [89]. Neue Antibiotika-Therapien, die sich bereits in der klinischen Phase III befinden, zielen entweder auf die Substitution des Protonenpumpeninhibitors [90, 91] oder auf die Variation der Antibiotika Anzahl ab [92]. Eine vielversprechende Studie der Firma RedHill Biopharma Ltd., welche die Wirksamkeit von RHB-105 erprobte, zeigte eine deutlich höhere Wirksamkeit gegenüber der aktuellen Standard Triple-Therapie und zeigt somit Potenzial, die bereits vorhandene Therapie zu ersetzen. RHB-105, kommerziell unter dem Namen Talicia<sup>®</sup> verfügbar, besteht aus dem Protonenpumpeninhibitor Omeprazole und den zwei Antibiotika Amoxicillin und Rifabutin. Seit 2019 ist Talicia<sup>®</sup> in den USA durch die U.S. Food and Drug Administration als neue *H. pylori*-Therapie zugelassen.

### 1.5 Alternative und neuartige Eradikationsstrategien

#### 1.5.1 Vakzinierung

Die Überlegung einer Vakzinierung besteht bereits seit 30 Jahren. Diese blieb aber bisher in unterschiedlichen Versuchen in klinischen Phasen erfolglos oder wurde nicht weiter verfolgt [93, 94]. Gründe für erfolglose klinische Studien lassen sich auf die genetische Diversität, Immunoregulations- und Immuntoleranz-Mechanismen von *H. pylori* sowie auf die Limitierung von Maus-Modellen zurückführen [95]. Eine entscheidende Frage bei der Impfstoffentwicklung ist, ob ein prophylaktischer oder therapeutischer Impfstoff vorteilhafter wäre. Da der Großteil der Erstinfektionen bereits im Kindesalter auftritt, müsste eine prophylaktische Impfung bereits in den ersten Lebensjahren stattfinden, um einen effektiven Schutz zu bieten. Eine Phase III Studie, bei der ein prophylaktisches orales rekombinantes *H. pylori* Vakzin an Kindern im Alter zwischen 6 und 15 Jahren getestet wurde, zeigte, dass zum Zeitpunkt der Impfung circa 20 % der Probanden bereits einer Erstinfektion unterlagen [93]. Eine Infektion mit *H. pylori* verläuft in der Regel symptomlos und schwere Folgen wie Magenkrebs entstehen wenn überhaupt meist erst ab dem 50. Lebensjahr, weshalb die Vorzüge einer prophylaktischen Impfung sehr spät eintreten würden [96]. Gegen eine prophylaktische Vakzinierung spricht, dass eine *H. pylori*-Infektion seit längerem in zunehmender Assoziation mit dem Schutz vor einer Vielzahl an Krankheiten steht wie zum Beispiel Asthma und der gastroösophagealen Refluxkrankheit [97, 98].

### 1.5.2 Antimikrobielle Peptide

Eine Alternative zu Antibiotika stellen antimikrobielle Peptide (AMPs) dar. Diese kennzeichnen sich häufig durch ihre kationische, amphiphile Peptidsequenz, bestehend aus 10–60 Aminosäuren mit antimikrobieller Wirkung [99]. Im Vergleich zu Antibiotika bieten AMPs den großen Vorteil, dass eine Resistenzentwicklung sehr unwahrscheinlich ist, da AMPs oft mit mehreren Zielen mit niedriger Affinität interagieren wie z.B. mit Zellmembranen und die Synthese der Membranbausteine auf komplexen Biosynthese-Routen beruht [100]. Eine Umstrukturierung der Zellmembran wäre daher mit hohen energetischen Kosten verbunden. Weiterhin gelten die Abbauprodukte von AMPs gegenüber *Small Molecules* als sicherer, da es sich um natürlich vorkommende Aminosäuren handelt [101] und aufgrund der kurzen Halbwertszeit reichern sich nur wenige Peptide in Geweben an [102]. In Abhängigkeit vom jeweiligen AMP erfolgt die antimikrobielle Wirkung durch Interaktion mit der Zellmembran, Immunmodulation oder Inhibition intrazellulärer Funktionen. Zwei bekannte AMPs mit antimikrobieller Wirkung gegenüber *H. pylori* stellen die Peptide LL-37 [103, 104] und Nisin A dar [105]. Bei LL-37 handelt es sich um ein humanes AMP mit Alpha-helikaler Struktur, welches natürlich durch humane Magenschleimhautzellen bei einer *H. pylori*-Infektion freigesetzt wird [103]. Es zerstört die Zellmembran, zeigt Anti-Biofilm Aktivität und fungiert für die Chemotaxis von unterschiedlichen Immunzellen [106]. Nisin A bildet Poren in der Zellmembran aus und blockiert die Zellwand-Biosynthese durch Interaktion mit membrangebundenem Lipid II [107]. LL-37 findet bereits Anwendung in klinischen Phasen zur Behandlung von venösen Beinschwüren [108]. Weiterhin ist Nisin A als Nahrungskonservierungsmittel zugelassen und trägt den *Generally Recognized As Safe* Status [109].

### 1.5.3 Bakterielle *Drug-Delivery* Systeme

Um einen Wirkstoff zielgerichtet zu einem bestimmten Ort zu bringen, können Bakterien in lebende Vehikel-Systeme überführt werden. Dabei kann ihre Verträglichkeit und Funktionalität durch gentechnische Methoden optimiert werden, indem aus dem Genom beispielsweise bestimmte Pathogenitätsfaktoren deletiert oder z.B. eradizierende oder immunogene Expressionskassetten integriert werden.

Einige bakterielle Vehikel-Systeme für eine *H. pylori*-Therapie wurden bereits in der Literatur beschrieben. Diese fokussieren sich jedoch auf Vakzin-Plattformen und nicht auf die Freisetzung direkt eradizierender Komponenten. Milchsäurebakterien bieten zu diesem Zweck als Antigen-Vehikel-System den Vorteil, dass diese nicht pathogen sind, den Magen nicht

kolonisieren können und einige Stämme bei der U.S. Food and Drug Administration den Status *Generally Recognized As Safe* (GRAS) tragen. Ein rekombinanter *Lactococcus lactis* Stamm, welcher das CagL-Protein exprimiert, wurde bereits als lebender oraler Impfstoff in Maus Infektionsversuchen erprobt, wo es als immunogen eine humorale Immunantwort induzierte [110]. *H. pylori* verfügt allerdings über diverse Virulenzfaktoren, die in der Pathogenese involviert sind, weshalb multivalente gegenüber univalenten Vakzinen wahrscheinlicher einen effektiveren Schutz bieten. Ein solcher multivalenter Impfstoff wurde auf Basis von den vier *H. pylori* Proteinen CagA, Urease, VacA und dem Neutrophil-aktivierenden-Protein entwickelt und mittels *L. lactis* als Vehikel *in vivo* erprobt [111]. Dieser Ansatz induzierte nicht nur eine humorale Immunantwort gegenüber den unterschiedlichen Pathogenitätsfaktoren, sondern zeigte zudem eine verbesserte Spezifität gegenüber Mikrofaltenzellen [111]. Die Aufnahme von Antigenen durch Mikrofaltenzellen über die Schleimhaut in das Schleimhaut-assoziierte lymphatische Gewebe ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Schluckimpfung [111]. Alternative bakterielle Vehikel wie *Saccharomyces cerevisiae* wurden ebenfalls als Vakzin-Plattform ausgetestet und lösten ebenfalls eine signifikante humorale Immunantwort *in vivo* aus [112].

Neben probiotischen Ansätzen wurde *H. pylori* erstmalig als biologisches *Drug-Delivery*-System durch die australische Firma Ondek Pty. Ltd. beschrieben. Hierbei wurde ein Verfahren für eine kontrollierte Ausbildung einer persistenten Infektion durch einen modifizierten *H. pylori*-Stamm patentiert sowie ein Verfahren zum Schutz gegen das Pathogen selbst und die notwendigen Schritte zur Verabreichung einer immunologisch wirksamen Menge [113]. Hierbei handelt es sich um einen attenuierten *H. pylori*-Stamm, welcher sich durch eine modifizierte funktionale Urease kennzeichnet und weiterhin Mäuse infizieren, jedoch keine persistente Infektion etablieren oder aufrechterhalten kann [113]. Darüber hinaus ist dieser Stamm in der Lage, eine oder mehrere Antigene zu exprimieren, darunter auch ein solches von *H. pylori* [113].

## 1.6 Zielsetzung

Das humanadaptierte Pathogen *H. pylori* ist der ätiologische Erreger verschiedener gastroduodener Ulkuserkrankungen wie der chronischen Gastritis sowie die Ursache von MALT-Lymphomen und Adenokarzinomen des Magens. Aktuell erfolgt eine Therapie durch die Kombination von mindestens zwei Antibiotika mit einem Protonenpumpenhemmer. Aufgrund von bestehenden Resistenzen von *H. pylori* gegenüber therapierelevanten Antibiotika und der limitierten Anzahl verfügbarer Wirkstoffe [114], ist eine Antibiotika-Behandlung auf Dauer nicht zielführend. Daher besteht ein Bedarf nach neuen Antibiotika-freien Therapieansätzen für die Eradikation von *H. pylori*-Infektionen.

Als Alternative zu den bereits auf dem Markt verfügbaren Antibiotika-Therapien soll im Rahmen dieser Arbeit ein Modellsystem eines attenuierten *H. pylori*-Stamms entwickelt werden, welches als induzierbares *Drug-Delivery*-System einen Wirkstoff am Ort der Infektion freisetzen kann. Sobald dieser trojanische Stamm in unmittelbarer Nähe zum Pathogen kolonisiert, werden die durch *H. pylori* natürlich freigesetzten bakteriellen Botenstoffe (Autoinducer vom Typ AI-2) durch den Trojaner aufgenommen. Diese AI sollen dann im Trojaner die Expression einer AI-2-regulierbaren Kasette induzieren. Für den *Proof-of-Concept* soll zuerst eine Reporter-kasette verwendet werden, wobei der Reporter perspektivisch als Platzhalter für die Integration einer AMP DNA-Sequenz dienen soll. Um eine Selbstinduktion zu verhindern, darf der trojanische Stamm selbst nicht in der Lage sein, AI-2 zu synthetisieren. Weiterhin soll der Stamm einen geringeren Zytokin-Titer auslösen, indem die Pathogenität des Trojaners schrittweise durch die Deletion einzelner Pathogenitätsfaktoren reduziert wird, ohne dabei aber die Fähigkeit zur Kolonisierung signifikant zu beeinflussen. Hierfür soll mittels geeigneter analytischer Verfahren die Abwesenheit der deletierten Pathogenitätsfaktoren bestätigt werden. Nachfolgend sollen dann humane mukogene Magenschleimhautzellen mit dem Trojaner und dem Wildtyp-Stamm infiziert werden, um sowohl die Immunantwort durch die Quantifizierung des Zytokin-Titers als auch RT-PCR-basiert die Kolonisierungseffizienz zu bewerten. Als Alternative zum Antibiotikum sollen für die Eradikation AMPs verwendet werden, welche bereits in der Literatur beschrieben sind. Da die Wirksamkeit der AMPs gegen *H. pylori* in der Literatur unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen untersucht wurden, lassen sich keine vergleichenden Rückschlüsse auf die Wirksamkeit der AMP untereinander ziehen. Daher soll im Rahmen dieser Arbeit die antimikrobielle Wirksamkeit ausgewählter AMPs gegen *H. pylori* unter gleichen Versuchsbedingungen analysiert werden, um die effizientesten AMP-Kandidaten zu

identifizieren. Weiterhin sollen diese AMPs hinsichtlich ihrer hämolytischen und zytotoxischen Aktivität sowie auf ihre Sensitivität gegenüber dem im menschlichen Magen vorkommenden Verdauungsenzym Pepsin beurteilt werden. Um zu entscheiden, welche Promotorsysteme für die Induktion der Expressionskassette eingesetzt werden können, war es von Bedeutung zu untersuchen, welche AI durch *H. pylori* gebildet werden. In der Literatur wird bisher lediglich die Bildung von AI-2 beschrieben. Daher soll in dieser Arbeit geprüft werden, ob *H. pylori* weitere AI der Klassen AI-1 und/oder AI-3 bildet. Finales Ziel dieser Arbeit ist es, eine funktional regulierbare AI-2 Reporter-kassette in einen attenuierten *H. pylori* Trojaner zu integrieren.

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial

Alle Medien, Puffer, Antikörper, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Kits sowie Geräte und Software, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind im Anhang aufgelistet (Tabelle 20, Tabelle 21, Tabelle 22, Tabelle 23, Tabelle 24, Tabelle 25, Tabelle 26). Weiterhin wurden alle Medien, Puffer, Reagenzien und Lösungen, wenn nicht anders angegeben, in MilliQ Reinstwasser, nachfolgend als MilliQ abgekürzt, angesetzt. Bakterielle Medien wurden vor ihrer Verwendung autoklaviert, wohingegen Medien für die Zellkultur direkt steril erworben wurden. Thermolabile Medienkomponenten wie zum Beispiel Antibiotika (Tabelle 21) wurden mittels 0,2 µm Filter (Tabelle 24) filtriert und dem entsprechenden Kulturmedium oder Agar bei einer Temperatur < 60°C hinzugefügt. Die Lagerung der verwendeten Medien (Tabelle 20) erfolgte bei 4°C.

#### 2.1.2 Bakterienstämme und Zelllinien

Alle bakteriellen Stämme (Tabelle 1) wurden entweder bei NEB GmbH (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, DE) oder bei DSMZ GmbH (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, DE) bestellt. Die Stämme wurden bei -80°C im entsprechenden Kulturmedium (Tabelle 20) und 50 % Glycerol gelagert.

Die humane Zelllinie AGS wurde bei der Firma CLS GmbH (Cell Lines Service, Eppelheim, DE) erworben. Entsprechende Kryo-Vials mit einer Zellkonzentration  $\sim 2 \cdot 10^6$  Zellen  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> in Ividi Freezing Medium Classic (Tabelle 23) wurden freundlicherweise durch Katrin Hauten (Fraunhofer IME, Aachen, DE) erstellt und bei -196°C in der Gasphase eines Stickstoffstanks (Tabelle 25) gelagert. Eine adhärente humane mukogene Magenschleimhautzelllinie wurde für direkte Versuchszwecke freundlicherweise durch Prof. Dr. Silja Wessler und Dr. Marina Cañadas Ortega (Paris Lodron Universität Salzburg, Salzburg, AT) als bereits passagierte vitale Zelllinie zur Verfügung gestellt. Es erfolgte keine Lagerung dieser Zelllinie in Form von Kryo-Vials.

Tabelle 1: Bakterienstämme und Zelllinien

Bakterienstamm	Genotyp	Plasmid	Hersteller
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>fhuA2</i> $\Delta$ ( <i>argF-lacZ</i> )U169, <i>phoA</i> , <i>glnV44</i> , $\Phi$ 80 $\Delta$ ( <i>lacZ</i> )M15, <i>gyrA96</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i>	n.a.	NEB GmbH
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	s.o.	pMK3	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	s.o.	pUreA-difH- RC-R	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	s.o.	pTZ12	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	s.o.	pTZ13	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	s.o.	pTZ14	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	s.o.	pTZ17	Diese Arbeit
<i>Y. enterocolitica</i> DSM 11503	n.a.	n.a.	DSMZ GmbH
<i>H. pylori</i> DSM 21031, Zellbank Stocks mit OD <sub>600</sub> = 10	n.a.	n.a.	DSMZ GmbH
<i>H. pylori</i> HP1	<i>rpsL</i> (Lys88Arg)	n.a.	Diese Arbeit
<i>H. pylori</i> HP2	<i>rpsL</i> (Lys88Arg), $\Delta$ <i>luxS</i>	n.a.	Diese Arbeit
<i>H. pylori</i> HP3	<i>rpsL</i> (Lys88Arg), $\Delta$ <i>luxS</i> , $\Delta$ <i>vacA</i>	n.a.	Diese Arbeit
<i>H. pylori</i> HP4	<i>rpsL</i> (Lys88Arg), $\Delta$ <i>luxS</i> , $\Delta$ <i>vacA</i> , $\Delta$ <i>iceA2</i>	n.a.	Diese Arbeit
<i>H. pylori</i> HP5	<i>rpsL</i> (Lys88Arg), $\Delta$ <i>luxS</i> , $\Delta$ <i>vacA</i> , $\Delta$ <i>iceA2</i> , $\Delta$ <i>cagA</i>	n.a.	Diese Arbeit
Zelllinie	Genotyp	Hersteller	
AGS, adhären	n.a.	n.a.	CLS GmbH
Humane mukogene Magenschleimhautzelllinie, adhären	n.a.	n.a.	Prof. Dr. Silja Wessler, PLUS

*E. coli* = *Escherichia coli*; *Y. enterocolitica* = *Yersinia enterocolitica*; *H. pylori* = *Helicobacter pylori*; AGS = Epithelzellen eines Magenadenokarzinoms; Cm<sup>R</sup> = Chloramphenicol-Resistenz; n.a. = nicht anwendbar; s.o. = siehe oben; PLUS = Paris Lodron Universität Salzburg.

### 2.1.3 Antimikrobielle Peptide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Peptide, mit Ausnahme von Nisin A, wurden durch den Synthesedienstleister mit Festphasensynthese hergestellt und mittels HPLC aufgereinigt ( $\geq 95\%$ ). Die Peptide wurden jeweils als Lyophilisat bereitgestellt und in DPBS oder DMSO ( $\geq 99,5\%$ ) in der jeweiligen Konzentration gelöst (Tabelle 2). Bezogen wurden diese bei der Firma GenScript Biotech B.V. und LL-37 bei der Firma InvivoGen Europe (Toulouse, FR).

Nisin A wurde als Nisin Ready Made Solution ( $38134 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$  in  $0,02 \text{ M HCl}$ ) (Tabelle 23) bei der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, DE) bezogen und besitzt fünf Lanthionin-Ringe, welche durch posttranslationale Modifikationen gebildet wurden. Dieses AMP wurde in DPBS auf eine Peptid-Konzentration von  $0,2 \text{ mM}$  verdünnt (Tabelle 2). Die Umrechnung der Potenz von  $\text{IU} \cdot \text{mg}^{-1}$  in die Stoffmengenkonzentration erfolgte unter der Annahme, dass  $1 \text{ IU}$  einer Masse von  $0,025 \mu\text{g}$  Nisin A entspricht [115]. Für Nisin A standen keine Informationen zur Herstellung, Aufreinigung und Reinheit zur Verfügung. Alle Arbeiten mit AMPs wurden ausschließlich in Protein LoBind® Reaktionsgefäßen (Tabelle 24) durchgeführt und die Lagerung der Stammlösungen erfolgte bei  $-80^\circ\text{C}$ . Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten AMPs.

**Tabelle 2: Antimikrobielle Peptide**

Name	Peptidsequenz	Konzentration (mM)	Solvenz
MSI-78	GIGKFLKKAKKFGKAFVKILKK-NH <sub>2</sub>	2	DMSO
TP4	FIHHIIGGLFSAGKAIHRLIRRRR-NH <sub>2</sub>	2	DMSO
Epinecidin-1	GFIFHIIKGLFHAGKMIHGLV-NH <sub>2</sub>	2	DMSO
SolyC	FSGGNCRGFRRCFCTK-NH <sub>2</sub>	2	DMSO
Bicarinalin	KIKIPWGKVKDFLVGGMKAV-NH <sub>2</sub>	2	DMSO
PGLa-AM1	GMASKAGSVLGKVAKVALKAAL-NH <sub>2</sub>	2	DMSO
Temporin-Sha	FLSGIVGMLGKLF-NH <sub>2</sub>	2	DMSO
Nst1	FLSGIVGMLAKLF-NH <sub>2</sub>	2	DMSO
$\alpha$ -S2-Casein	QKALNEINQF-NH <sub>2</sub>	2	DMSO
Kontrollpeptid	RVQGRWKVRKSFF-COOH	2	DMSO
BAMP	AGKLNVR-NH <sub>2</sub>	2	DMSO
Buf IIIb	RVVRQWPIGRVRRVRRVVR-NH <sub>2</sub>	3	DMSO
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPR TES-COOH	0,2	DPBS
Nisin A	 ITSISLCTPGCKTGALMGCNMTATCHCSIHVSK	0,2	HCl
Melittin	GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ-COOH	2	DMSO

Alle Aminosäuren, welche durch Klammern verbunden sind, bilden Lanthionin-Ringe aus. Das Peptid Nisin A wurde in  $14 \text{ mM HCl}$  gelöst. Alle anderen Peptide außer LL-37 wurden in DMSO ( $\geq 99,5 \%$ ) oder DPBS gelöst.

### 2.1.4 Primer

Alle verwendeten Primer (Tabelle 19) wurden ausschließlich bei der Firma Integrated DNA Technologies Inc. (Leuven, BE) synthetisiert,  $100 \mu\text{M}$  in MilliQ gelöst und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.1.5 Plasmide

Als Grundlage für die Stammentwicklung diente das Plasmid pUreA-difH-RC-R (Tabelle 3), welches freundlicherweise durch Dr. Aleksandra Debowski und Prof. Dr. Barry Marshall (The University of Western Australia, Perth, AU) zur Verfügung gestellt und für entsprechende Target-Loci modifiziert wurde. Die Erzeugung markerloser Deletionen auf Basis dieses Plasmid-Systems wird durch einen Integrationsschritt über zwei zum Ziellocus flankierenden homologen DNA-Sequenzen initiiert, welche durch ein *Selection/Counter-Selection* System mit flankierenden Tyrosin-Rekombinase Erkennungssequenzen (difH) getrennt sind. Das Selektionssystem beinhaltet für den ersten Selektionsschritt ein *cat*-Gen, welches für eine Chloramphenicol-Acetyltransferase codiert und dem Stamm eine Chloramphenicol-Resistenz verleiht sowie ein mutiertes Allel des ribosomalen Proteins S12 (*rpsL*), welches dem Stamm für eine nachfolgende Gegenselektion eine Streptomycin-Sensitivität verleiht. Daher ist die Voraussetzung zur Nutzung dieses Plasmides, dass der Stamm über eine Streptomycin-Resistenz verfügt. Eine wirtseigene *H. pylori* Tyrosin-Rekombinase XerH kann die zur Kasette flankierenden difH-Sequenzen ortsspezifisch erkennen und über homologe Rekombination zusammen mit der Kasette aus dem Genom entfernen, wodurch final eine markerlose Deletion entsteht (Abbildung 1). Das Plasmid pTZ17 ist in Abbildung 2 repräsentativ für alle Deletionsplasmide dargestellt.

Als Ausgangspunkt für die Erstellung von Lumineszenz-basierten Reporterplasmiden wurde das Plasmid pMK3 (Tabelle 3) verwendet. Dieses beinhaltet eine Reporter-kassette bestehend aus dem LsrR-regulierbaren Promotor  $P_{\text{Lsr}}$  und dem *luxCDABE*-Operon. Die Gene *luxCDE* codieren hierbei für einen Fettsäure-Reduktase-Komplex. Dieser stellt das Substrat für die Lumineszenz-Reaktion bereit, welche durch die Luciferase LuxAB katalysiert wird. Die Transkription des Operons steht unter der Kontrolle des  $P_{\text{Lsr}}$  und wird durch einen Wirtsgenom codierten LsrR Repressor reprimiert [116]. Liegt intrazellulär phosphorylierter AI-2 vor, bindet dieses am Repressor, wodurch eine Konformationsänderung ausgelöst und die Reprimierung des  $P_{\text{Lsr}}$  aufgehoben wird [116]. Hierdurch kann das Operon transkribiert werden und ein Lumineszenz-Signal entsteht.

Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Name	Beschreibung	Selektionsmarker	Ursprung
pMK3	$P_{\text{Isr}}\text{-luxCDABE}$	<i>nptII</i>	Quh-Lab Lebensmittelsicherheit, Siegen, DE
pUreA-difH-RC	<i>rpsL-cat</i>	<i>bla, rpsL, cat</i>	Dr. Aleksandra Debowski und Prof. Dr. Barry Marshall [117]
pTZ12	Deletion <i>luxS</i> -Locus	<i>bla, rpsL, cat</i>	Diese Arbeit
pTZ13	Deletion <i>vacA</i> -Locus	<i>bla, rpsL, cat</i>	Diese Arbeit
pTZ14	Deletion <i>iceA2</i> -Locus	<i>bla, rpsL, cat</i>	Diese Arbeit
pTZ17	Deletion <i>cagA</i> -Locus	<i>bla, rpsL, cat</i>	Diese Arbeit

Die Selektionsmarker codieren für Gene, welche dem Stamm eine Resistenz gegenüber Kanamycin (*nptII*), Ampicillin (*bla*) oder Chloramphenicol (*cat*) verleihen. Ein mutiertes *rpsL*-Allel verleiht dem Stamm eine Streptomycin-Sensitivität.

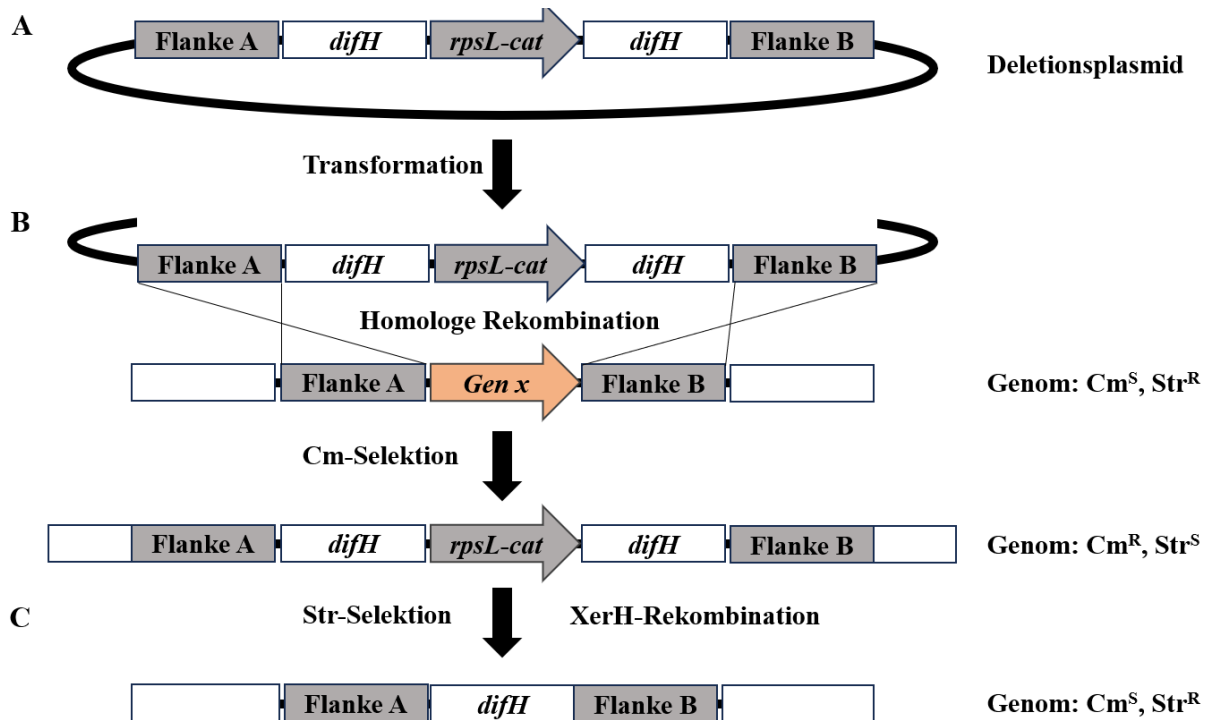
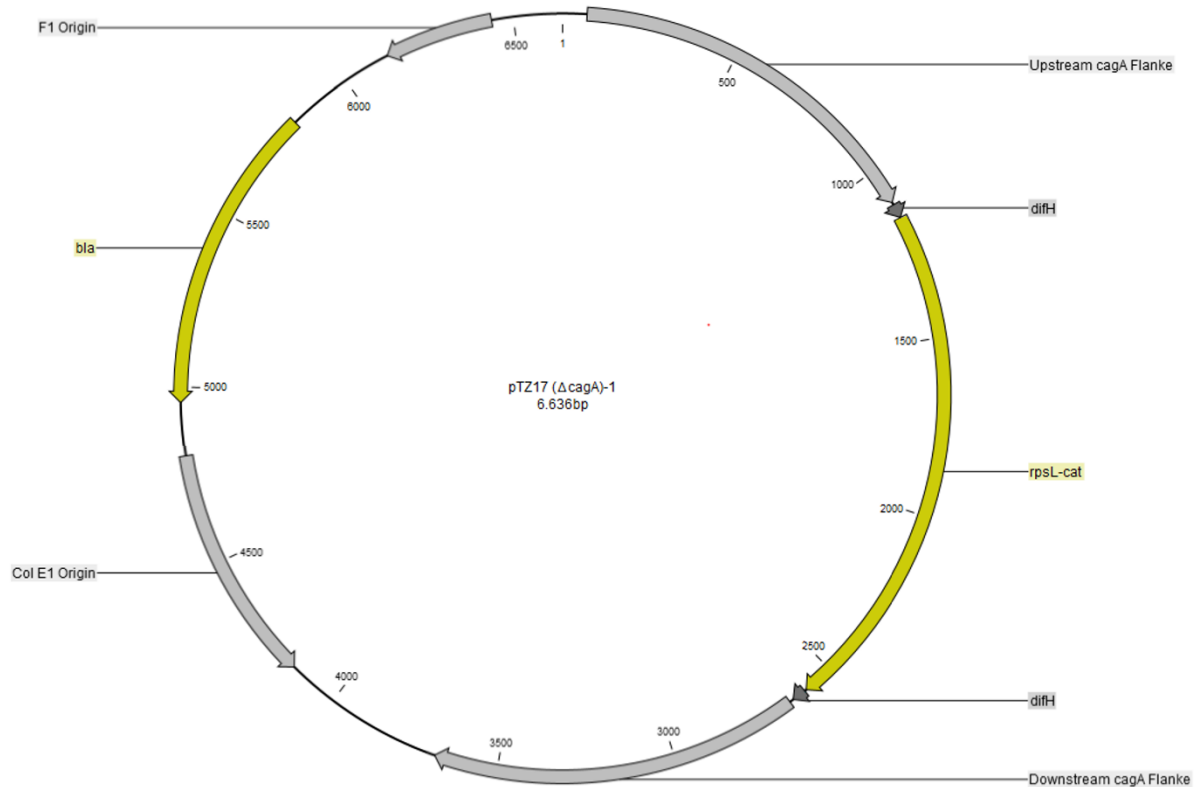


Abbildung 1: Darstellung des Rekombinationssystems zur Erzeugung von genomischen Modifikationen

Ein Deletionsplasmid enthält zwei zum Ziellokus flankierende homologe DNA-Sequenzen (Flanke A und B) und zwei Erkennungssequenzen (*difH*) für die wirtseigene Tyrosin-Rekombinase (XerH). Weiterhin ist eine *Selection-Counterselection*-Kassette im Plasmid codiert, welche das *cat*-Gen beinhaltet und dem Stamm eine Chloramphenicol-Resistenz (Cm<sup>R</sup>) verleiht, sowie ein mutiertes *rpsL*-Allel von *H. pylori*, wodurch der Stamm sensitiv gegenüber Streptomycin (Str<sup>S</sup>) wird (A). Eine anschließende Transformation eines *H. pylori*-Stamms (Cm<sup>S</sup>, Str<sup>R</sup>) mit diesem Deletionsplasmid führt zur Rekombination zwischen homologen DNA-Sequenzen des Plasmids und dem Genom, wodurch das Zielgen (orange) durch die Selektionskassette und *difH*-Sequenzen des Plasmids ersetzt wird. Eine anschließende Selektion mit Chloramphenicol beseitigt alle Bakterienzellen, welche nicht die Selektionskassette im Genom tragen (B). Eine weitere XerH-vermittelte Rekombination entfernt anhand der zwei *difH*-Sequenzen die Selektionskassette und eine *difH*-Sequenz aus dem Genom. Eine nachfolgende Selektion mit Streptomycin resultiert in Klone ohne Selektionskassette im Genom (C). Abbildung gemäß Debowski *et al.* 2013, angepasst.



**Abbildung 2: Plasmidkarte von pTZ17 für die Deletion des *cagA*-Locus**

Das Deletionsplasmid pTZ17 verfügt über zwei zum *cagA*-Locus homologe Flanken. Weiterhin trägt das Plasmid drei Selektionsmarker: Ampicillin- (*bla*) und Chloramphenicol-Resistenzmarker (*cat*) sowie ein mutiertes Allel des ribosomalen Proteins S12 (*rpsL*). Zwei Tyrosin-Rekombinase Erkennungssequenzen (*difH*) ermöglichen das spätere Entfernen der integrierten *rpsL-cat*-Kassette aus dem Genom. Codierende DNA-Sequenzen sind in gelb und nicht codierende Sequenzen in grau dargestellt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Bakterielle Kultivierung

#### 2.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

*E. coli* wurde in dieser Arbeit ausschließlich in Flüssigmedium kultiviert, um einzelne Klone aus Transformationsansätzen (2.2.3.10) zu vermehren und die enthaltene Plasmid-DNA des Klons zu isolieren (2.2.3.1). Diese wurde nachfolgend dafür verwendet, um *H. pylori* mit der aufgereinigten Plasmid-DNA zu transformieren (2.2.3.11).

Ausgehend von einem Glycerol-Stock (Tabelle 1) erfolgte mittels Impföse ein Verdünnungsausstrich auf einer LB-Agarplatte mit Antibiotikum (Tabelle 20), wobei die Auswahl des Antibiotikums vom jeweiligen Selektionsmarker des Plasmides abhing (Tabelle 3). Die Agarplatte wurde anschließend für einen Tag bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurde ein 100 mL Erlenmeyerkolben mit Schikane und 10 mL LB-Medium (Tabelle 20) sowie entsprechendem Antibiotikum vorbereitet (Tabelle 3, Tabelle 20). Das Medium wurde mit

einem Klon inokuliert, indem ausgehend von der Agarplatte eine alleinstehende Kolonie mittels Pipettenspitze isoliert und die Spitze in die Kultur überführt wurde. Die Inkubation erfolgte über Nacht (ü.N.) bei 37°C und 160 rpm. Die Inokulation von Flüssigkulturen mit Klonen aus einem Transformationsansatz erfolgte identisch (2.2.3.10).

Für die Herstellung von Glycerol-Stocks wurden ausgehend von einer ü.N.-Kultur 5 mL Kultur mit 50 % Glycerol in einem 15 mL Falcon auf einem Vortexer für 5 sec auf maximaler Stufe gemischt. Anschließend wurden 1,5 mL des Ansatzes in Kryo-Vials überführt. Pro Klon wurden jeweils drei Glycerol-Stocks erstellt, welche unmittelbar bei -80°C gelagert wurden.

### 2.2.1.2 Erstellung einer *H. pylori* Zellbank

*H. pylori*-Stämme wachsen oftmals zwischen zwei und drei Tagen auf einer Agarplatte, wenn diese ausgehend von einem Glycerol-Stock ausgestrichen werden. Das vollständige Ausplattieren eines konzentrierten Glycerol-Stocks bietet den Vorteil, dass bereits am Folgetag ein dichter vitaler Zellrasen vorliegt, wodurch auf eine lange Inkubationszeit verzichtet werden kann. Daher wurde eine Zellbank von vitalen *H. pylori* DSM 21031-Zellen mit definierter OD<sub>600</sub> erstellt, welche für die Versuche in dieser Arbeit verwendet wurde.

Hierfür wurde ausgehend von einem Glycerol-Stock (Tabelle 1) mittels Impföse Zellmaterial entnommen, sodass der Ring der Impföse sichtbar mit Zellmaterial benetzt war. Auf eine 37°C vortemperierte HP-Agarplatte (Tabelle 20) wurde das gesamte Zellmaterial zentral und kreisförmig aufgetragen (1 cm ø). Die Platte wurde in einem begasbaren Vakuum-Exsikkator (Tabelle 25) gestellt und mit der MZ 2C Membran-Vakuumpumpe (Tabelle 25) wurde die enthaltene Atmosphäre bis zu einem Druck von -0,08 MPa evakuiert. Danach wurde der Exsikkator mit einem Mischgas (3 % H<sub>2</sub>, 5 % O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 87 % N<sub>2</sub>) (Tabelle 24) geflutet, bis Atmosphärendruck erreicht wurde. Die Verwendung des Mischgases für Kultivierungszwecke wird nachfolgend als mikroaerophile Konditionierung bezeichnet. Anschließend folgte eine Inkubation bei 37°C für 72 h. Der gesamte Zellrasen auf der Agarplatte wurde mittels sterilen Wattestäbchen in einem Reaktionsgefäß mit 1 mL HP-Medium (Tabelle 20) (37°C) suspendiert. 500 µL der Bakteriensuspension wurden jeweils auf eine 37°C temperierte HP-Agarplatte mittels Drigalski-Spatel ausplattiert. Die Platte wurde wie oben beschrieben im Exsikkator bei 37°C für 24 inkubiert. Am darauffolgenden Tag war auf den Agarplatten ein dichter Zellrasen sichtbar. Mittels Wattestäbchen wurden die Zellen von der Agarplatte geerntet und in 4 mL vorgewärmten HP-Medium (37°C) in einem 5 mL Reaktionsgefäß suspendiert. Der Ansatz wurde für 5 sec auf dem Vortexer gemischt. Das gesamte Volumen wurde nachfolgend ausplattiert, indem 500 µL der Bakteriensuspension auf jeweils eine HP-

Agarplatte (37°C) mittels Drigalski-Spatel ausplattiert wurde. Die Agarplatten wurden in einem Exsikkator überführt und die Atmosphäre wie oben beschrieben mikroaerophil konditioniert. Die Platten wurden anschließend bei 37°C für 24 h inkubiert. Am Folgetag wurden die Bakterienzellen mittels Wattestäbchen von den Agarplatten geerntet und in 10 mL HP-Einfriermedium (4°C) (Tabelle 20) in einem 15 mL Falcon suspendiert. Die Bakteriensuspension wurde für 10 sec auf einem Vortexer gemischt. In einem 2 mL Reaktionsgefäß wurden 100 µL der Bakteriensuspension mit HP-Medium (37°C) so verdünnt, sodass die OD<sub>600</sub> zwischen 0,2 und 0,8 lag. Der Ansatz wurde in einem 15 mL Falcon mit HP-Einfriermedium (Tabelle 20) auf eine OD<sub>600</sub> = 10 eingestellt. Final wurden 500 µL der Zellsuspension in Kryo-Vials überführt. Die Lagerung der Vials erfolgte bei -80°C.

### 2.2.1.3 Kultivierung von *H. pylori*

Für die Erstellung einer *H. pylori*-Flüssigkultur wurde ein Glycerol-Stock einer *H. pylori* DSM 21031 Zellbank (2.2.1.2) auf Eis für 15 min aufgetaut. Das gesamte Volumen wurde auf einer HP-Agarplatte mittels Drigalski-Spatel ausplattiert und die Platte wurde in einem Exsikkator unter mikroaerophilen Konditionen bei 37°C für 24 h inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mittels Wattestäbchen in 1,5 mL HP-Medium (37°C) suspendiert und die OD<sub>600</sub> wurde bestimmt. Ein 100 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikane mit 15 mL HP-Medium (37°C) wurde nachfolgend mit einer OD<sub>600</sub> = 0,05 inokuliert. Der Kolben wurde mit einer Haftmatte (Tabelle 24) im Exsikkator befestigt und die Atmosphäre wurde mikroaerophil konditioniert (2.2.1.2). Der Exsikkator wurde auf dem Tablar des Multitron Standard Inkubationsschüttlers (Tabelle 25) mit einer weiteren Klebematte und Spanngurten fixiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C und 100 rpm für 24 h.

Sollten AI-2 oder das VacA-Protein aus dem Kulturüberstand nachgewiesen werden, so wurden 1–2 mL der jeweiligen Kultur in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Für die Messung des VacA-Proteins wurden die Flüssigkulturen vor der Zentrifugation auf eine OD<sub>600</sub> = 0,7 in HP-Medium eingestellt. Anschließend wurden die Proben für 1 min bei 16.000 x g zentrifugiert, der Überstand mittels 0,2 µm Filter filtriert und das Filtrat bei -80°C gelagert.

### 2.2.1.4 AMP-Wirksamkeitstest im BioLector® Pro

Die Aufnahme von Wachstumskinetiken von *H. pylori* DSM 21031 unter mikroaerophilen Konditionen erfolgte mittels BioLector® Pro System, welches die kontinuierliche Aufnahme des *Light Scatters* über die Zeit ermöglicht.

Für die Kultivierung von *H. pylori* DSM 21031 im BioLector<sup>®</sup> Pro (Tabelle 25) wurde ein Aliquot einer Zellbank (2.2.1.2) ausplattiert und eine Flüssigkultur mit einer finalen OD<sub>600</sub> = 0,15 erstellt (2.2.1.3). Die Flüssigkultur wurde für 5–6 h bei 100 rpm und 37°C kultiviert bis eine finale OD<sub>600</sub> ~0,5 vorlag. Vor dem Ansetzen der bakteriellen Stammkultur wurden die AMPs (Tabelle 2) zunächst auf eine Stoffmengenkonzentration von 20 µM in vorgewärmtem HP-Medium verdünnt und anschließend wurden 500 µL des jeweiligen AMPs in die Wells einer FlowerPlate<sup>®</sup> 48-Well-Mikrotiterplatte (MTP) (Tabelle 24) überführt. Pro AMP wurde eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt. Ausgehend von der angesetzten Flüssigkultur wurde eine Stammkultur mit einer OD<sub>600</sub> = 0,1 erstellt, indem die Flüssigkultur in vorgewärmtem HP-Medium verdünnt und direkt für 10 sec auf dem Vortexer gemischt wurde. Pro Versuch wurde ein Volumen von 40 mL in einem 50 mL Falcon angesetzt. Anschließend wurden 500 µL der bakteriellen Stammkultur in die Wells überführt, um eine finale OD<sub>600</sub> = 0,05 und eine Stoffmengenkonzentration der AMPs von 10 µM zu erreichen. Für jedes Peptid wurden weiterhin als Blank 500 µL des jeweiligen AMPs mit 500 µL HP-Medium gemischt, um die Peptidabsorption zu berücksichtigen. Des Weiteren wurden pro Platte als Positivkontrolle 10 µM Streptomycin mitgeführt. Als Negativkontrolle wurde ein AMP mit einer zufällig ausgewählten Peptidsequenz verwendet, welche keine antimikrobielle Wirkung zeigen soll und daher namentlich als „Kontrollpeptid“ (Tabelle 2) definiert wurde. Weiterhin wurden entsprechende Vehikel- bzw. Wachstumskontrollen mitgeführt, welche den Lösungsmittelanteil für DMSO und HCl berücksichtigen. Als Vehikelkontrolle für das AMP LL-37 wurde HP-Medium verwendet. Der finale Lösungsmittelanteil der AMPs pro Well in einem Volumen von 1 mL betrug 0,5 % (v/v) DMSO bzw. 0,7 mM HCl für Nisin A (Tabelle 2). Das AMP LL-37 wurde in Dulbecco's *Phosphate Buffered Saline* (DPBS) gelöst (Tabelle 23), weshalb für dieses Peptid kein Lösungsmittelanteil berücksichtigt wurde. Die Platte wurde im Nachgang mit einer Gas-permeablen Folie mit Verdunstungsschutzschicht (Tabelle 24) versiegelt und im Exsikkator mikroaerophil vorkonditioniert, wie unter 2.2.1.2 beschrieben. Eine Anaerobier-Kammer für 48-Well-MTP (Tabelle 25) wurde anschließend über die MTP platziert, mit dem dazugehörigen Deckel verschlossen und in den BioLector<sup>®</sup> Pro gestellt. Danach wurde die Kammer mit den Gasschläuchen des BioLector<sup>®</sup> Pro verbunden, welcher wiederum über einen Massenflussregler für Gas (Tabelle 25) mit einem mikroaerophilen Mischgas verbunden war. Für den kontinuierlichen Fluss des Mischgases durch die Kammer während der Kultivierung wurde der Arbeitsdruck am Druckminderer der Gasflasche auf 2 bar eingestellt. Die Kammer wurde vor Beginn der Messung für 5 min mit dem mikroaerophilen Mischgas konditioniert und im Anschluss wurde die Messung gestartet. Die Inkubation erfolgte

für 48 h bei 37°C, 800 rpm, 85 % Luftfeuchtigkeit und die Lichtstreuung wurde kontinuierlich mit einem Gain = 7 alle 10 min gemessen. Der Versuch wurde in jeweils drei technischen Replikaten in Form von drei biologischen Replikaten durchgeführt ( $n = 3$ ). Die Messdaten wurden kontinuierlich über einen angebundnenen Laptop mit der Software BioLecton (Tabelle 26) abgebildet. Die Rohdaten wurden nach der Messung auf Basis eines unveröffentlichten Python Skripts und der Software Spyder (Tabelle 26) grafisch ausgewertet. Das Python Skript wurde freundlicherweise durch Carlos Helbig (Fraunhofer IME) bereitgestellt. Der BioLector® Pro wurde freundlicherweise durch die Abteilung Industrielle Biotechnologie (Fraunhofer IME) zur Verfügung gestellt.

### 2.2.1.5 Aufnahme von Dosis-Wirksamkeitskurven

Ausgehend von einem Glycerol-Stock wurde *H. pylori* DSM 21031 auf einer vorgewärmten GC-Agarplatte (Tabelle 20) mit einer Impföse ausgestrichen und mikroaerophil bei 37°C für 48 h inkubiert. Hierfür wurden die Platten in einem 2,5 L-Behälter mit Plattenträger (AnaeroJar) (Tabelle 25) gestellt und die mikroaerophile Atmosphäre im Behälter wurde durch den Inhalt eines CampyGen™ 2.5 L-Beutel (Tabelle 24) erzeugt. Dieser beinhaltet eine Mischung aus CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> sowie einen Katalysator, der die Umsetzung von Wasserstoff mit Sauerstoff zu H<sub>2</sub>O katalysiert, wodurch der Sauerstoffgehalt im Behälter reduziert wird. Nach 48 h Inkubation wurde ausgehend von der dicht bewachsenen Agarplatte etwas Zellmaterial mit einem sterilen Wattestäbchen entnommen, in 1 mL DPBS suspendiert und die OD<sub>600</sub> bestimmt. Eine Flüssigkultur mit 20 mL vorgewärmtem HP-Medium in einem 50 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikane wurde nachfolgend mit einer finalen OD<sub>600</sub> = 0,1 inokuliert. Der Kolben wurde in einem AnaeroJar mit einem CampyGen™ 2.5 L-Beutel auf einer Klebmatte im Multitron Standard Inkubationsschüttler fixiert und bei 37°C und 50 rpm für 24 h inkubiert. Die AMPs LL-37 und Nisin A wurden in vorgewärmtes Medium in einem Reaktionsgefäß verdünnt und im Anschluss wurden 100 µL der jeweiligen Verdünnung in die Wells einer Nunc™ Edge™ 2.0 96-Well-Mikrotiterplatte (Tabelle 24) pipettiert, sodass innerhalb der Platte ein Stoffmengenkonzentrationsgradient von 100–0,1 µM vorlag. Weiterhin wurden Blanks bestehend aus Kulturmedium und der jeweiligen Stoffmengenkonzentration des Peptides mitgeführt, um die Absorption des Peptides bei der jeweiligen Konzentration zu ermitteln, sowie für Nisin A eine Vehikelkontrolle, um den Einfluss des Lösungsmittels HCl auf das bakterielle Wachstum zu berücksichtigen. Für LL-37 wurde keine Vehikelkontrolle mitgeführt, da dieses Peptid in DPBS gelöst wurde. Darüber hinaus wurde eine Wachstumskontrolle, bestehend aus HP-Medium mit *H. pylori*-Kultur, und eine Sterilkontrolle, bestehend aus HP-

Medium ohne Kultur, pro Platte mitgeführt. Um die Verdunstungsrate zu reduzieren, wurden die umlaufenden Reservoirs der MTP mit 10 mL 0,2 % Agarose (Tabelle 21) und alle nicht verwendeten äußeren Wells mit 200 µL HP-Medium befüllt. In einem 50 mL Falcon wurde im Anschluss eine Bakterienstammlösung mit einer  $OD_{600} = 0,1$  in vorgewärmtem HP-Medium erstellt. 100 µL dieser Stammlösung wurde zu den jeweiligen Wells mit einer Multipipette (Tabelle 25) und einem 5 mL Combitip (Tabelle 24) pipettiert, sodass eine finale  $OD_{600} = 0,05$  vorlag. Die Platte wurde im Anschluss mit Tesafilm fixiert und in den CLARIOstar® Plus mit einer Atmosphären Kontrolleinheit (Tabelle 25) gestellt. Die Inkubation erfolgte für 40 h bei 37°C und 500 rpm (*Double Orbital* Modus) unter mikroaerophilen Konditionen (10 % CO<sub>2</sub> und 5 % O<sub>2</sub>), wobei vor dem ersten Zyklus die Platte für 30 sec bei 400 rpm geschüttelt wurde. Die Aufnahme von Wachstumskinetiken erfolgte alle 30 min bei einer Wellenlänge von 600 nm (*Well Scan = Orbital Average*, 2 mm ø; *No. Of Flashes = 10*). Jede Peptidkonzentration wurde in jeweils drei technischen Replikaten in Form von drei biologischen Replikaten gemessen. Die Peptidabsorption ( $Absorption_{Medium + Peptid} - Absorption_{Medium}$ ) wurde von der jeweiligen Probe in entsprechender Konzentration subtrahiert und anschließend wurden die Ergebnisse in GraphPad Prism (Tabelle 26) auf die Wachstumskontrolle (100 %) und die Sterilkontrolle (0 %) normalisiert. Ein biologisches Replikat für Nisin A wurde durch Dr. Gernot Posselt (PLUS, Salzburg, AT) erstellt.

### 2.2.2 Zellkultur – Kultivierung und Assays

#### 2.2.2.1 Kultivierung von AGS-Zellen

Humane Zellen aus dem Adenokarzinom des Magens (Tabelle 1) (AGS) wurden routinemäßig in 15 mL Dulbecco's *Modified Eagle Medium* (DMEM) + 10 % Fetales Kälberserum (FKS), nachfolgend AGS-Medium (Tabelle 20) genannt, kultiviert. Ausgehend von einer ~80 % konfluenten Kultur wurden die Zellen mittels Zellschaber gelöst und mit einer 25 mL Pipette suspendiert. In eine neue T25-Zellkulturflasche (Tabelle 24) wurde vorgewärmtes AGS-Medium vorgelegt und die suspendierten Zellen 1:6 verdünnt, sodass ein finales Volumen von 10 mL vorlag. Die Passage wurde im CO<sub>2</sub>-Inkubator (Tabelle 25) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> unter feuchter Atmosphäre (nachfolgend Standardbedingung genannt) für vier bis fünf Tage inkubiert, wobei nach zwei bis drei Tagen das Medium gewechselt wurde. Vor jeder Passagierung wurden die Zellen unter dem Mikroskop (Tabelle 25) hinsichtlich ihrer Viabilität begutachtet. Wurden AGS-Zellen aus einem Kryo-Vial kultiviert, so wurden diese mindestens fünf Mal passagiert, bevor sie für anstehende Versuche verwendet wurden. Weiterhin wurden die Zellen nicht mehr als 30-mal passagiert. Die initiale Bereitstellung einer vitalen Zelllinie

aus einem Kryo-Vial für die oben beschriebene Passagierung erfolgte durch Katrin Hauten (Fraunhofer IME).

### 2.2.2.2 Zytotoxizitätstest

Ausgehend von einer fünf Tage alten ca. 80 % konfluenten Kultur in einer T75-Zellkulturflasche (2.2.2.1) wurden die enthaltenen AGS-Zellen geerntet. Hierzu wurde das Medium verworfen und der Monolayer zwei Mal mit 5 mL DPBS gewaschen, indem das Volumen in der Zellkulturflasche vorsichtig geschwenkt und direkt verworfen wurde. Anschließend wurden 5 mL TrypLE™ Express (Tabelle 23) hinzugegeben und der Ansatz wurde bei 37°C für 5 min inkubiert. Weiterhin wurden 15 mL AGS-Medium zu dem Ansatz gegeben und dieser wurde mit einer 25 mL Pipette mehrfach suspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 50 mL Falcon überführt und bei  $300 \times g$  für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 5 mL AGS-Medium suspendiert. Für die Zellzahlbestimmung mit dem Gerät CASY TT (Tabelle 25) wurden 50  $\mu\text{L}$  der Zellsuspension entnommen, in einem CASYcub (Tabelle 24) mit 10 mL CASYton (Tabelle 24) durch Invertieren gemischt und final wurde mittels CASY TT die Zellzahl bestimmt. Hierfür wurden die folgenden Einstellungen gewählt:

- Kapillare = 150  $\mu\text{m}$
- Probenvolumen = 400  $\mu\text{L}$
- Zyklen = 3
- X-Achse = 50  $\mu\text{m}$ , Y-Achse = Auto
- Verdünnungsfaktor =  $2,01 \cdot 10^2$
- *Evaluation Cursor*: 11,13–48,88  $\mu\text{m}$
- *Normalisation Cursor*: 7,50–48,88  $\mu\text{m}$
- Aggregationskorrektur = Auto; *Debris* = On

Nachfolgend wurde in einem 50 mL Falcon eine Stammlösung mit  $1 \cdot 10^5$  Zellen  $\cdot \text{mL}^{-1}$  in AGS-Medium angesetzt und jeweils 100  $\mu\text{L}$  in einer 96-Well-MTP (PS, F-Boden, transparent, steril) (Tabelle 24) überführt. Die Platte wurde in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator unter Standardbedingungen für 24 h inkubiert. Am Folgetag wurden die jeweiligen Peptidstammlösungen (Tabelle 2) auf eine Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  in AGS-Medium verdünnt. Fünfzig  $\mu\text{L}$  wurden aus allen Vertiefungen der 96-Well-MTP verworfen und jeweils 50  $\mu\text{L}$  AMP-Lösung wurde zu den Wells gegeben, um eine finale Stoffmengenkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  an AMP zu erreichen. Als Positivkontrolle wurde das Peptid Melittin (Tabelle 2) in gleicher Konzentration und eine SDS-Lösung (final 0,2 % (w/v) SDS pro Well) (Tabelle 21) verwendet. Eine Reihe der MTP

wurde mit AGS-Medium ohne Zellen angesetzt (Blank). Unbehandelte Zellen wurden in AGS-Medium kultiviert und dienten als Wachstumskontrolle. Als Vehikelkontrollen wurden final 0,5 % (v/v) DMSO bzw. 0,7 mM HCl gelöst in AGS-Medium verwendet. Die Platte wurde weiterhin für 24 h im CO<sub>2</sub>-Inkubator unter Standardbedingungen inkubiert. 10 µL alamarBlue™ HS Zellviabilitätsreagenz (Tabelle 23) wurde zu allen Wells der MTP gegeben und die Platte wurde weiter für 4 h unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurden 50 µL pro Well in eine 96-Well-MTP (Polystyrol, *Half Area*, schwarz) (Tabelle 24) überführt. Die Fluoreszenzdetektion wurde im CLARIOstar® MTP-Reader (Tabelle 25) bei einer Extinktionswellenlänge von 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm mit einem Gain = 900 durchgeführt. Vor jeder Messung wurde die MTP für 10 sec bei 300 rpm geschüttelt (*Double Orbital* Modus). Der Versuch wurde in Form acht technischer Replikate in jeweils drei biologischen Replikaten durchgeführt. Die Berechnung der relativen Viabilität erfolgte mit Gleichung 1.

$$\text{Gleichung 1: Viabilität (\%)} = \frac{(\lambda_{590\text{nm}}(\text{Probe}) - \lambda_{590\text{nm}}(\text{Medium Blank}))}{(\lambda_{590\text{nm}}(\text{VK}) - \lambda_{590\text{nm}}(\text{Medium Blank}))} \cdot 100$$

### 2.2.2.3 Passagierung und Kultivierung von mukogenen Magenschleimhautzellen

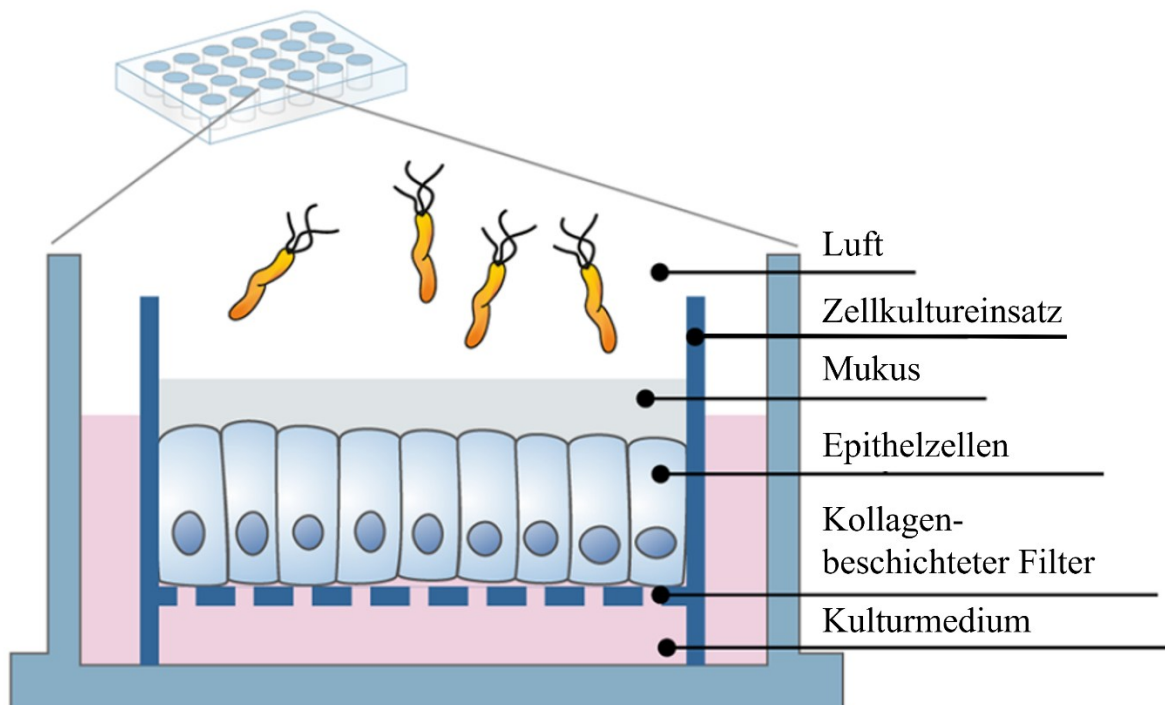
Humane mukogene Magenschleimhautzellen wurden in dieser Arbeit kultiviert, um ein möglichst *in vivo* nahes Magenmodell für *in vitro* Infektionsversuche mit *H. pylori* darzustellen. Diese Zellen sind im Gegensatz zu gängigen Magenschleimhautzelllinien in der Lage, eine apikale Mukusschicht auszubilden, welche auch im menschlichen Magen vorliegt und als natürliche Schutzschicht des Magens fungiert. Die Kultivierung erfolgte in einer 24-Well-MTP mit Zellkultureinsätzen, welche jeweils aus einer Halterung für die Vertiefungen einer 24-Well-Platte sowie aus einem Filter für die Kultivierung von Zellkulturen bestehen. Im Gegensatz zu einer Kultivierung von adhären Zellen in einer T-Flasche, stehen die auf dem Filter angehefteten Zellen apikal und basolateral in Kontakt mit dem Medium, wodurch Zellwachstum, -funktion und -struktur eher einer *in vivo* Kultur ähnelt. Um eine *H. pylori*-Infektion zu simulieren, können die Bakterienzellen apikal auf die Zellkultur gegeben werden. Die Kultivierung der Zellen für Infektionsversuche ist in Abbildung 3 dargestellt.

Für jede benötigte Kultur wurde jeweils ein Millicell® Zellkultureinsatz (Tabelle 24) in eine 24-Well CytoOne® Platte (Tabelle 24) überführt und 150 µL einer Kollagen-Lösung (Tabelle 21) wurde auf den Filter des Zellkultureinsatzes gegeben. Die Zellkultureinsätze wurden für 45 min bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator unter feuchter Atmosphäre temperiert. Danach wurde der

Überstand verworfen und die Filter der Zellkultureinsätze wurden zwei Mal mit 600  $\mu\text{L}$  vorgewärmtem DPBS gewaschen, indem das DPBS auf den Filter und in das Reservoir gegeben und danach unmittelbar verworfen wurde. Die Ansätze wurden anschließend für 1 h unter der laminaren Strömung der Cleanbench getrocknet und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Am Tag der Passagierung wurden die Filter erneut in 600  $\mu\text{L}$  DPBS gewaschen.

Ausgehend von drei Wochen alten humanen mukogenen Magenschleimhautzellen (Tabelle 1) wurde eine Passagierung durchgeführt. Hierzu wurde das Medium und der Mukus der Zellen durch Abpipettieren verworfen. Anschließend wurde der Filter von unten drei Mal mit 600  $\mu\text{L}$  DPBS und von oben drei Mal mit 400  $\mu\text{L}$  DPBS gewaschen, indem das DPBS hinzu pipettiert und unmittelbar verworfen wurde. Für die Dissoziation der adhären Zellen von dem Filter wurden jeweils 400  $\mu\text{L}$  TrypLE™ Express in das Reservoir des Wells und 200  $\mu\text{L}$  TrypLE™ Express auf den Filter gegeben. Die Ansätze wurden für 30 min bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert und die Zellen wurden alle 10 min mit der Pipette suspendiert. Die Zellsuspension auf dem Filter wurde anschließend in ein 15 mL Falcon mit 5 mL vorgewärmten ADF+++-Medium (Tabelle 20) transferiert und das Falcon wurde für die Zellernte bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator zwischengelagert. Erneut wurden zwei Mal 200  $\mu\text{L}$  TrypLE™ auf den Filter gegeben, jeweils für acht Minuten wie oben beschrieben inkubiert und die Ansätze final zu den Zellen in das Falcon gegeben. Vorhandene Zellaggregate wurden durch mehrfaches vorsichtiges auf- und abpipettieren gelöst. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen seriell in DPBS verdünnt und 10  $\mu\text{L}$  der jeweiligen Verdünnung mit 10  $\mu\text{L}$  einer 0,4 % Trypanblau-Lösung (Tabelle 24) gemischt. Die Zellkonzentration wurde mittels Neubauer-Kammer (Tabelle 25) unter dem Mikroskop bestimmt. Anschließend wurden die Zellen bei 300 x g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde nachfolgend zwei Mal gewaschen, indem der Überstand verworfen, das Pellet in 5 mL ADF++-Medium (Tabelle 20) suspendiert und erneut bei 300 x g für 5 min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde erneut verworfen und die Zellzahl auf  $2 \cdot 10^5 \text{ Zellen} \cdot \text{mL}^{-1}$  eingestellt, indem die Zellen in einem entsprechenden Volumen ALI-Medium (7,5  $\mu\text{M}$  ROCK-I) (Tabelle 20) suspendiert wurden. In einer 24-Well CytoOne® Platte wurde nachfolgend die benötigte Menge an Zellkultureinsätzen vorgelegt, welche zuvor auf Raumtemperatur (RT) gebracht wurden. Anschließend wurden 200  $\mu\text{L}$  der Zellsuspension auf den Kollagen-beschichteten Filter des Zellkultureinsatzes überführt und jeweils 600  $\mu\text{L}$  ALI-Medium (7,5  $\mu\text{M}$  ROCK-I) in die Reservoirs der Wells pipettiert, wodurch die Zellen basolateral und apikal in Kontakt mit dem Medium standen. Weiterhin wurde je 1 mL DPBS in nicht belegte Wells der 24-Well-Platte pipettiert, um die Verdunstung zu reduzieren. Die Inkubation der Zellen mit ALI-Medium mit erhöhter ROCK-I-Konzentration erfolgte für drei

Tage bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator, um die Anheftung und Ausbildung einer Zellschicht zu begünstigen und um die Apoptose zu verhindern. Nachfolgend wurde das Medium aus den Reservoirs sowie der Mukus und das Medium von der Zelloberfläche verworfen und 600 µL vorgewärmtes ALI-Medium (1,5 µM ROCK-I) in die Unterseite der Reservoirs überführt, wodurch die Zellen apikal in Kontakt mit der Atmosphäre standen, und die Polarisierung der Zellen induziert wurde. Die Zellkultur-Ansätze wurden je nach Passagierung insgesamt für zwei bis drei Wochen bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert, wobei der Wechsel des ALI-Medium (1,5 µM ROCK-I) und der Verwurf des Mukus alle zwei Tage erfolgte. Die Beschichtung der Zellkultureinsätze und die Passagierung wurde für einen biologischen Ansatz durch Dr. Marina Cañadas Ortega (Paris Lodron Universität Salzburg, Salzburg, AT) durchgeführt.



**Abbildung 3: 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. Abbildung angepasst: Boccellato *et al.* 2019.

#### **2.2.2.4 Infektion von humanen mukogenen Magenschleimhautzellen**

Für die Infektion wurden die Stämme *H. pylori* DSM 21031 und HP4 vier Tage vor der Infektion auf einer GC-Agarplatte ausplattiert und bei 37°C in einem AnaeroJar mit einem CampyGen™ 2.5 L-Beutel inkubiert. Ausgehend von dicht bewachsenen Agarplatten wurde

mittels Impföse etwas Zellmaterial des jeweiligen Stamms auf eine neue GC-Agarplatte ausgestrichen und bei 37°C für 24 h erneut mikroaerophil inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Zellrasen der Platte des jeweiligen Stamms in 1 mL vorgewärmtes DPBS in einem Reaktionsgefäß mittels Wattestäbchen suspendiert, um eine Arbeitslösung mit einer  $OD_{600} = 2,36$  ( $\sim 1 \cdot 10^8$  Zellen  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) anzusetzen. Am Tag der Infektion wurden zwei bis drei Wochen alte mukogene Magenschleimhautzell-Ansätze von jeweils zwei unterschiedlichen Spendern mit einer Zellzahl von  $\sim 1 \cdot 10^6$  Zellen  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> eingesetzt (2.2.2.3). Der Mukus und das Medium wurden am Tag der Infektion verworfen und 600  $\mu$ L Antibiotika-freies ALI-Medium in die jeweiligen Wells pipettiert. Anschließend wurden 100  $\mu$ L der jeweiligen *H. pylori* Arbeitslösung auf die jeweiligen Filter pipettiert, sodass die Ansätze mit einer *Multiplicity Of Infection* (MOI) = 100 infiziert wurden. Als Negativkontrolle wurde DPBS verwendet. Die Inkubation der infizierten Ansätze erfolgte für 24 h bzw. 72 h bei 37 C und 10 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank.

### 2.2.2.5 Isolierung humaner Erythrozyten

Für die Isolierung von humanen Erythrozyten (hE) wurden 30 mL Vollblut durch Dr. med. Marius Heintschel von Heinegg unter sterilen Bedingungen mit einer Venofix® Safety Nadel (Tabelle 24) entnommen und für diese Arbeit bereitgestellt. Das Vollblut wurde in einem 50 mL Falcon mit 3 mL 3,13 % Natriumcitrat-Lösung (Tabelle 23) als Antikoagulans durch Invertieren gemischt und bis zur weiteren Aufarbeitung am selben Tag bei 4°C gelagert. Das Vollblut wurde bei 400  $\times$  g für 5 min bei 4°C zentrifugiert und die obere Plasmafraktion wurde verworfen. Anschließend wurde der Ansatz mit 10 mL DPBS durch Invertieren gemischt, bis alle pelletierten Bestandteile suspendiert wurden. Der Wasch- und Zentrifugationsschritt wurde insgesamt sechs Mal durchgeführt und final wurde das Pellet in 5 mL DPBS gelöst. 100  $\mu$ L der aufgereinigten hE wurden seriell in DPBS verdünnt und 10  $\mu$ L der jeweiligen Verdünnung mit 10  $\mu$ L einer 0,4 % Trypanblau-Lösung (Tabelle 24) gemischt, um die Erythrozyten mittels Neubauerkammer unter dem Mikroskop auszuzählen.

### 2.2.2.6 Bestimmung der hämolytischen Aktivität der AMPs

Die Bestimmung der relativen Hämolyse orientierte sich an der Methode nach Greco *et al.* [118]. Hierzu wurden jedes AMPs ausgehend von der jeweiligen Stammlösung (Tabelle 2) in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß auf eine Konzentration von 20  $\mu$ M in DPBS verdünnt. Hundert  $\mu$ L aufgereinigte hE mit  $5 \cdot 10^8$  hE  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> (2.2.2.5) wurden zusammen mit 100  $\mu$ L der

jeweiligen 20 µM AMP-Lösung in eine 96-Well-MTP (U-Boden, Polypropylen) (Tabelle 24) pipettiert und diese mittels Verschlussfolie (Tabelle 24) versiegelt. Final lag eine Stoffmengenkonzentration von 10 µM AMP pro Well vor. Als Positivkontrolle wurde eine 1 % Triton™ X-100-Lösung (Tabelle 21) verwendet. Als Vehikelkontrolle wurden die jeweiligen Lösungsmittel der AMPs (Tabelle 2) in das Kulturmedium hinzugefügt. Da das AMP LL-37 in DPBS gelöst vorlag, wurde hier kein Lösungsmittelanteil berücksichtigt. Als Positivkontrolle wurde das Peptid Melittin und als Negativkontrolle das Peptid „Kontrollpeptid“ (Tabelle 2) verwendet. Die Platte wurden bei 300 rpm für 30 sec im CLARIOstar® MTP-Reader gemischt und für 1 h im CO<sub>2</sub>-Inkubator unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurde die MTP bei 1500 x g für 5 min bei RT zentrifugiert und es wurden je Well 100 µL Überstand entnommen und in eine neue 96-Well-MTP (Polystyrol, F-Boden, transparent, unsteril) (Tabelle 24) überführt. Die Platte wurde erneut bei 1000 x g für 1 min bei RT zentrifugiert, um entstandene Luftblasen zu entfernen. Final wurde die Absorption im CLARIOstar® MTP-Reader bei 405 nm gemessen. Der Versuch wurde in drei technischen Replikaten in Form von drei biologischen Replikaten durchgeführt ( $n = 3$ ). Die relative hämolytische Aktivität wurde mit Gleichung 2 berechnet:

$$\text{Gleichung 2: Hämolyse (\%)} = \frac{\text{OD}_{405}(\text{Probe})}{\bar{x}\text{OD}_{405}(\text{Triton X} - 100)} \cdot 100$$

### 2.2.3 Molekulare Methoden

#### 2.2.3.1 Isolierung von DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Flüssigkulturen (2.2.1.1) erfolgte nach Herstellerangaben des NucleoSpin Plasmid Kits (Tabelle 24).

Wurde DNA aus PCR-Ansätzen aufgereinigt, so wurde dies ausschließlich nach Herstellerangabe des NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits (Tabelle 24) durchgeführt. Wurde genomische DNA oder Plasmid-DNA als Template im PCR-Ansatz verwendet, so erfolgte die Aufreinigung des PCR-Produktes direkt mittels Kit. Eine präparative Aufreinigung des PCR-Produktes aus einem Agarosegel auf dem UV-Transilluminator VWR LM-20E (Tabelle 25) mit einem Skalpell wurde durchgeführt, wenn lineare DNA-Fragmente oder Fragmente gleicher Größe zum erwartenden PCR-Produkt eingesetzt wurden (2.2.3.7). Die Durchführung der präparativen Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben des Kits (Tabelle 24). Final erfolgte eine Quantifizierung der DNA-Konzentration mittels NanoDrop 2000 (2.2.3.3).

### 2.2.3.2 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA aus Infektionsversuchen erfolgte nach Herstellerangaben des TRIzol™ Reagenz (Tabelle 23). Zu Beginn wurde das Medium aus den Wells und der Mukus von den Filtern separat in RNase-freie Reaktionsgefäße überführt. Um die Zellen zu waschen wurden 600 µL vorgewärmtes DPBS auf jeden Filter gegeben und die 24-Well-Platte wurde für 5 min bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die Filter wurden jeweils in ein trockenes Well überführt. Danach wurden unter einem Abzug 500 µL TRIzol™ Reagenz pro Filter zu den Zellen gegeben und die Zellen auf dem Filter für 30 sec suspendiert. Die Suspension wurde in ein RNase-freies Reaktionsgefäß überführt und für 5 min inkubiert. Es wurden 100 µL Chloroform hinzugegeben, der Ansatz wurde gemischt und für 15 min auf Eis gelagert. Nachfolgend wurde der Ansatz für 15 min bei 12.000 x g bei 4°C zentrifugiert und die wässrige Phase in ein RNase-freies Reaktionsgefäß pipettiert. Diese wurde mit 250 µL Isopropanol durch sechsfache Invertierung gemischt und für 10 min inkubiert, um die enthaltene RNA zu präzipitieren. Im Folgenden wurde die Probe für 15 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es wurden 500 µL 75 % Ethanol (-20°C) hinzugegeben, der Ansatz wurde gemischt und für 5 min bei 7500 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbliebene Ethanol für 15–30 min unter dem Abzug evaporiert. Final wurde das getrocknete Pellet in 50 µL RNase-freiem Wasser suspendiert, die Probe für 1 h auf Eis hydratisiert und die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt (2.2.3.3). Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C.

### 2.2.3.3 Quantifizierung von DNA- und RNA-Proben

Die Quantifizierung von DNA- und RNA-Proben erfolgte durch das Spektralphotometer NanoDrop 2000 (Tabelle 25) mit 2 µL des Analyten. Weiterhin wurde die Reinheit des Analyten durch die Messung des Verhältnisses  $A_{280\text{nm}} \cdot A_{260\text{nm}}^{-1}$  sowie  $A_{260\text{nm}} \cdot A_{230\text{nm}}^{-1}$  bestimmt.

### 2.2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifikation von DNA über die Polymerase Kettenreaktion (PCR) erfolgte mit dem Q5® High-Fidelity 2X Master Mix (Tabelle 24) und unterschiedlichen Primern (Tabelle 19). Wurde Plasmid-DNA als Template verwendet, so wurde standardmäßig 1 µL mit einer Konzentration von 10 ng · µL<sup>-1</sup> eingesetzt. Für PCR-Ansätze mit genomischer DNA wurde bakterielles

Zellmaterial von einer Agarplatte verwendet, indem eine einzelne Kolonie in 20 µL MilliQ in einem PCR-Reaktionsgefäß suspendiert wurde. Der Zellaufschluss erfolgte anschließend für 15 min bei 99°C im FlexCycler<sup>2</sup> (Tabelle 25). Der Ansatz wurde für 30 sec in einer Mini-Zentrifuge (Tabelle 25) zentrifugiert und 1 µL des Überstandes wurde als Template-DNA eingesetzt. Die Erstellung von PCR-Ansätzen (Tabelle 4) und die Amplifikation im FlexCycler<sup>2</sup> (Tabelle 5) erfolgte nach Herstellerangaben des Q5<sup>®</sup> High-Fidelity 2X Master Mix.

**Tabelle 4: PCR-Ansatz**

Komponente	25 µL Reaktion	50 µL Reaktion	Finale Konzentration
Q5 High Fidelity 2X Master Mix	12,5 µL	25 µL	1x
Forward Primer, 10 µM	1,25 µL	2,5 µL	0,5 µM
Reverse Primer, 10 µM	1,25 µL	2,5 µL	0,5 µM
DNA-Template	1 µL	1 µL	< 1000 ng
MilliQ	25 - x µL	50 - x µL	n.a.

PCR = Polymerase Kettenreaktion; n.a. = nicht anwendbar.

**Tabelle 5: PCR-Programm**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98°C	30 sec	1
Denaturierung	98°C	10 sec	} 35
Annealing	50 - 72°C	30 sec	
Elongation	72°C	30 sec · kbp <sup>-1</sup>	
Finale Elongation	72°C	2 min	1
Pause	4°C	-	1

PCR = Polymerase Kettenreaktion; kbp = Kilobasenpaar.

### 2.2.3.5 Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion

Die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurde in dieser Arbeit dazu verwendet, um die Kolonisierungseffizienz des jeweiligen *H. pylori*-Stamms an humanen mukogenen Magenschleimhautepithelzellen zu bestimmen. Hierfür wurden spezifische Primer zur Detektion der 16S rRNA von *H. pylori* (Primerpaar P202/203) und der RNA des sauren ribosomalen 60S-Proteins P0 (RPLP0) der verwendeten Zelllinie (Primerpaar P204/205) (Tabelle 19) verwendet. Für die Erstellung eines Ansatzes (Tabelle 6) wurde das Power SYBR<sup>™</sup> Green RNA-to C<sub>T</sub><sup>™</sup> 1-Step Kit (Tabelle 24) verwendet. Die Verwendung dieses Kits ermöglicht die Umschreibung der RNA in DNA und die nachfolgende Amplifikation der spezifischen DNA-Produkte in einem Reaktionsansatz. Die Ansätze wurden zusammen mit dem jeweiligen Primerpaar P202/203 bzw. P204/205 in 96-Well PCR-Platten (Tabelle 24) auf Eis pipettiert und

mit einer optischen adhäsiven Folie (Tabelle 24) verschlossen. Der RT-PCR-Lauf erfolgte nach Herstellerangaben des Kits (Tabelle 7) im QuantStudio 3 (Tabelle 25). Der Nachweis der DNA-Amplifikationsprodukte erfolgte mittels Fluoreszenz bei einer Extinktionswellenlänge von 498 nm und einer Emissionswellenlänge von 522 nm. Als Proben wurden verschiedene RNA-Proben und als Kontrolle wurde MilliQ verwendet. Jede Probe wurde in drei technischen Replikaten gemessen. Die Daten der gemessenen Fluoreszenzsignale wurden im Anschluss in die Software Design & Analysis 2 (Tabelle 26) importiert, um den *Cycle Threshold* (Ct) für die einzelnen Proben zu bestimmen. Die Bestimmung der Kolonisierungseffizienz erfolgte anhand von Gleichung 3.

$$\text{Gleichung 3: Kolonisierungseffizienz} = \frac{\text{Mittelwert Ct(RPLP0)}}{\text{Mittelwert Ct(16S rRNA)}}$$

**Tabelle 6: RT-PCR-Ansatz**

Komponente	20 µL Reaktion	Finale Konzentration
Power SYBR™ Green RT-PCR Mix (2x)	10 µL	1x
Forward Primer, 100 nM	2 µL	100 nM
Reverse Primer, 100 nM	2 µL	100 nM
RT Enzym Mix (125x)	0,16 µL	1x
RNA-Template	1 µL (50 ng)	2,5 ng · µL <sup>-1</sup>
MilliQ	25 - x µL	n.a.

n.a. = nicht anwendbar.

**Tabelle 7: RT-PCR-Programm**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklus
Reverse Transkription	48°C	30 min	1
Aktivierung Polymerase	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	15 sec	40
Annealing & Elongation	60°C	1 min	
	95°C	15 sec	1
Schmelzkurve	60°C	15 sec	1
	95°C	15 sec	1

### 2.2.3.6 Restriktion von DNA

Um den Erfolg einer Klonierung nachzuweisen, wurde aufgereinigte Plasmid-DNA (2.2.3.1) zuerst mit einem oder zwei Restriktionsenzymen (Tabelle 23) nach Herstellerangaben

hydrolysiert (Tabelle 8). Die Inkubation des Ansatzes erfolgte für 15 min bei 37°C in einem Thermoblock (Tabelle 25). Der Erfolg des Restriktionsverdau wurde im Anschluss mittels Agarose-Gelelektrophorese bestätigt (2.2.3.7).

**Tabelle 8: Enzymatische Restriktion von DNA-Proben**

Komponente	Volumen (µL)
Pro Restriktionsenzym	1 µL (10 Units)
DNA	x µL (300–1000 ng)
rCutSmart™ Buffer (10x)	5 µL (1x)
Gesamtvolumen	50 µL

### 2.2.3.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die größenabhängige Separation von DNA erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Hierzu wurden die Proben mittels Gel Loading Dye (Tabelle 24) nach Herstellerangaben einfach verdünnt und auf ein 0,8 % oder 1,2 % Agarosegel mit Ethidiumbromid (Tabelle 21) aufgetragen. Für die Größenabschätzung wurden 4 µL eines DNA-Längenmarkers (Tabelle 24) eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte im Mini-Sub Cell GT System (Tabelle 25) mit TBE-Puffer (1x) (Tabelle 21) als Laufpuffer für 40 min bei 120 V unter Verwendung der PowerPac™ Basic HC High-Current Power Supply (Tabelle 25) als Spannungsquelle. Die DNA-Banden wurden anschließend im Agarosegel mittels UV-Licht für präparative Arbeiten auf einem UV-Transilluminator (2.2.3.1) oder in der Gel Doc XR+ (Tabelle 25) zur Überprüfung von hydrolysierten Plasmid-DNA (2.2.3.6) visualisiert.

### 2.2.3.8 Klonierung

Die Klonierung von Plasmiden orientierte sich an den Herstellerangaben des NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (Tabelle 24). Für eine Assemblierung von DNA-Fragmenten wurden Primer mit 15–30 bp komplementären Überhängen (Tabelle 19) synthetisiert und in einer PCR eingesetzt (2.2.3.4). Für die Assemblierung wurden die benötigten DNA-Konzentrationen mittels NEBioCalculator® (Tabelle 26) berechnet und ein Klonierungsansatz in einem PCR- Reaktionsgefäß mit 50 ng Vektor-DNA und der berechneten Masse des Inserts erstellt (Tabelle 9). Es folgte eine Inkubation für 60 min bei 50°C im FlexCycler<sup>2</sup> und eine anschließende Probenlagerung bei 4°C bis zur weiteren Verwendung.

**Tabelle 9: Ansatz für eine Klonierung mittels NEBuilder® HiFi DNA Assembly**

Ansatz für Assemblierung	2–3 Fragmente	4–6 Fragmente
DNA-Stoffmengenverhältnis	1:2 (Vektor:Insert)	1:1 (Vektor:Insert)
Stoffmenge DNA gesamt	0,03–0,2 pmol (x µL)	0,2 pmol–0,5 pmol (x µL)
NEBuilder® HiFi DNA Assembly	5 µL	5 µL
Master Mix		
MilliQ	5 - x µL	5 - x µL
Gesamtvolumen	10 µL	10 µL

### 2.2.3.9 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Proben wurde nach Herstellerangaben des Mix2Seq Kits (Tabelle 24) mit entsprechenden Primern (Tabelle 19) durchgeführt und erfolgte durch die Firma Eurofins Genomics Europe Shared Services GmbH (Ebersberg, DE).

### 2.2.3.10 Hitzeschock-Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* DH5α (NEB GmbH, Frankfurt am Main, DE) (Tabelle 1) mit Plasmid-DNA erfolgte nach Herstellerangaben. Ein Aliquot mit einem Volumen von 50 µL wurde für 10 min auf Eis aufgetaut. 100 ng Plasmid-DNA (Tabelle 3) oder 5 µL eines Klonierungsansatzes wurden zu den Zellen pipettiert und für 30 min auf Eis gelagert. Im Anschluss wurden die Zellen in einen vorgeheizten Thermoblock überführt und für 30 sec bei 42°C inkubiert. Der Ansatz wurde daraufhin für 5 min auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 950 µL *Super Optimal Broth With Catabolite Repression* (SOC)-Medium (Tabelle 23) sowie ein weiterer Inkubationsschritt bei 160 rpm für 1 h bei 37°C auf dem VKS 75 A Control Vielkolbenschüttler (Tabelle 25) in einem Thermokonstantraum. Final wurden 50 µL des Transformationsansatzes auf einer vorgewärmten LB-Agarplatte (Tabelle 20) mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und die Platte ü.N. bei 37°C im Thermokonstantraum inkubiert.

### 2.2.3.11 Transformation und Genom-Editierung von *H. pylori*

Die Deletion von Genen aus dem Genom von *H. pylori* erfolgte in dieser Arbeit über die homologe Rekombination. Hierfür wurden zuerst Bakterienzellen mit PCR- oder Plasmid-DNA transformiert, die zwei ca. 1 kbp große homologe DNA-Sequenzen flankierend zum Ziellocus im Genom von *H. pylori* besitzen. Über die homologe Rekombination zwischen Sequenzen des

Plasmids und des Genoms wird der Ziellocus deletiert. Entsprechende Knockout-Stämme können nachfolgend mittels Antibiotika-Selektion isoliert werden (Abbildung 1).

Als Grundlage für die chromosomalen Modifikationen diente die Genomkarte von *H. pylori* ATCC 43504 (Stand 02.08.2021), welches durch die Firma American Type Culture Collection (Manassas, US) zur Verfügung gestellt wurde. Die Durchführung der Transformation von *H. pylori* DSM 21031 mit DNA-Produkten über die natürliche Kompetenz orientierte sich an der Methode von Debowski *et al.* [117]. Aus einem Glycerol-Stock wurde etwas Zellmaterial mit einer Impföse in Form eines Kreises (1 cm  $\varnothing$ ) auf eine vorgewärmte HP-Agarplatte zentral aufgebracht. Die Platte wurde anschließend bei 37°C für drei Tage mikroaerophil inkubiert (2.2.1.2). Der dichte Bakterienrasen wurde mittels Impföse vollständig abgenommen und auf eine weitere vorgewärmte HP-Agarplatte überführt, kreisförmig aufgetragen und bei 37°C für 24 h mikroaerophil inkubiert. Am Folgetag wurde der gesamte Bakterienrasen erneut auf eine vorgewärmte HP-Agarplatte überführt und bei 37°C für 5 h mikroaerophil inkubiert. Ein  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA (Tabelle 3) wurde auf den Zellrasen pipettiert und mittels Impföse verteilt. Nachfolgend wurde die Platte bei 37°C für 24 h mikroaerophil inkubiert. Für die Selektion wurde am darauffolgenden Tag eine Hälfte des Bakterienrasens mittels Impföse auf eine vorgewärmte HP-Agarplatte mit Chloramphenicol in Form eines Verdünnungsausstriches übertragen und die andere Hälfte wurde auf eine weitere HP-Agarplatte mit Chloramphenicol so ausgestrichen, dass die gesamte Agarplatte mit Bakterien benetzt wurde. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 7–10 d unter mikroaerophilen Bedingungen. Für eine anschließende Gegenselektion wurden 4–10 Klone mittels Verdünnungsausstrich auf eine vorgewärmte HP-Agarplatte mit Streptomycin überführt. Es folgte ein weiterer mikroaerophiler Inkubationsschritt bei 37°C für 7–10 d. Um einzelne Klone zu vermehren, wurde auf eine vorgewärmte HP-Agarplatte 10  $\mu\text{L}$  HP-Medium pipettiert und einzelne Klone mittels Impföse in das Medium übertragen. Die Ansätze wurden bei 37°C für zwei bis drei Tage mikroaerophil inkubiert. Das Zellmaterial eines jeweiligen Klons wurde mit einem Wattestäbchen in HP-Einfriermedium suspendiert und der Glycerol-Stock wurde bei -80°C eingefroren.

### 2.2.3.12 Isolierung von Gesamtzellproteinen

Entsprechende *H. pylori*-Stämme (Tabelle 1) wurden auf einer HP-Agarplatte ausgestrichen und für vier Tage mikroaerophil im Exsikkator inkubiert (2.2.1.2). Ausgehend von der dicht bewachsenen Platte wurden die Zellen mittels Impföse auf eine neue HP-Agarplatte passagiert und für zwei weitere Tage unter den gleichen Konditionen inkubiert. Für die Erstellung von *H. pylori* Zellextrakten wurden die Zellen von einer Agarplatte mittels Wattestäbchen geerntet

und in 1 mL DPBS suspendiert, sodass eine  $OD_{600} = 6,0$  vorlag. Der Ansatz wurde nachfolgend bei  $3500 \times g$  zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 200  $\mu$ L Lysis-Puffer (Tabelle 21) suspendiert, für 10 min auf Eis gelagert und bei  $15.000 \times g$  bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 10 min zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Gesamtzellproteinkonzentration nach Bradford anhand einer *Bovine Serum Albumin* (BSA) Standardgeraden nach Herstellerangaben des ROTI®Quant 5x Konzentrates (Tabelle 23). Für die BSA-Standardgerade wurden die Pierce™ Rinderserumalbumin-Standards (Tabelle 24) verwendet. Die Zellextrakte wurden bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.2.3.13 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Separation von Proteinen nach ihrer Masse erfolgte mittels *Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Die Proben wurden unter reduzierenden Bedingungen gemäß Tabelle 10 vorbereitet und bei  $70^{\circ}\text{C}$  für 10 min in einem Thermoblock denaturiert. 15  $\mu$ L der jeweiligen Probe, die jeweils 15  $\mu$ g des Zellextraktes enthielten, und 5  $\mu$ L des PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10–180 kDa) (Tabelle 24) als Größenmarker wurden anschließend in einem NuPAGE™ Bis-Tris 4–12 % Gradientengel (Tabelle 24) bei 200 V für 40 min separiert. Als Laufpuffer wurde der NuPAGE™ MES SDS-Laufpuffer (20x) (Tabelle 24) in MilliQ 1:20 verdünnt eingesetzt. Die Trennung erfolgte im XCell4 SureLock Midi-Cell Elektrophoresis System (Tabelle 25) mit dem PowerPac™ Basic HC High-Current Power Supply (Tabelle 25) als Spannungsquelle.

**Tabelle 10: Probenvorbereitung für SDS-PAGE**

Komponente	Volumen ( $\mu$ L)
Zellextrakt ( $1,54 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	26
NuPAGE™ LDS-Probenpuffer (4x)	10
NuPAGE™ Probenreduktionsmittel (10x)	4

### 2.2.3.14 Western-Blot

Nach erfolgter SDS-PAGE wurde das Gel für einen Western-Blot eingesetzt. Hierzu wurde eine  $0,2 \mu\text{m}$  Nitrocellulose Membran (Tabelle 24) für 5 min in  $4^{\circ}\text{C}$  temperiertem Transfer-Puffer (Tabelle 21) äquilibriert. Anschließend wurde das SDS-Gel auf die Membran aufgelegt und beidseitig mit jeweils einem Whatman™ Grade 3MM Chr Chromatographiepapier (Tabelle 24) und zwei Schwämmen eingespannt, welche zuvor in Transfer-Puffer benetzt wurden. Der Blotting-Prozess erfolgte mit Transfer-Puffer ( $4^{\circ}\text{C}$ ) bei 100 V für 60 min in einem Blotting

Modul (Tabelle 25) und dem PowerPac™ Basic HC High-Current Power Supply (Tabelle 25) als Spannungsquelle. Die Membran wurde anschließend für 1 h bei RT in Blockierungslösung (Tabelle 21) auf einem Wippschüttler (Tabelle 25) bei 15 rpm inkubiert. Die Membran wurde drei Mal für 5 min in PBS-T Puffer (Tabelle 21) bei 15 rpm gewaschen. Nachfolgend wurden die zwei Primärantikörper CagA3 (1:2500) und HtrA (1:10.000) (Tabelle 23) in 10 mL Blockierungslösung (Tabelle 21) pipettiert und die Membran mit der Lösung wie oben beschrieben ü.N. bei 4°C inkubiert. Die Primärantikörper wurden freundlicherweise durch Prof. Dr. Silja Wessler (Paris Lodron Universität Salzburg, Salzburg, AT) zur Verfügung gestellt. Erneut wurde die Membran wie bereits beschrieben gewaschen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper *Goat Anti-Rabbit* gekoppelt mit einer alkalischen Phosphatase (Tabelle 23) (1:5000) in 10 mL Blockierungslösung verdünnt und die Lösung wurde zur Membran gegeben. Der Ansatz wurde für 1,5 h bei RT bei 15 rpm inkubiert. Die Membran wurde erneut gewaschen, für 5 min in AP-Puffer (Tabelle 21) äquilibriert und der Puffer anschließend verworfen. Final wurde das Substrat Nitroblautetrazolium (NBT) und 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP) (Tabelle 21) 1:100 in 10 mL AP-Puffer verdünnt und die Substratlösung auf die Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte unter Lichtausschluss, bis deutliche Banden sichtbar wurden. Danach wurde der Puffer verworfen und die Membran drei Mal in 100 mL MilliQ gewaschen. Final wurde der Blot im ChemStudio PLUS (Tabelle 25) fotografiert.

### 2.2.3.15 Zytokin-Quantifizierung

Die Quantifizierung der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  aus Zellkulturmedium erfolgte mittels Human Luminex® Discovery Assay (Tabelle 24) nach Herstellerangaben durch Christian Fehring (Uniklinikum Essen, Essen, DE). Die entsprechenden Rohdaten wurden freundlicherweise durch Professor Dr. Astrid M. Westendorf (Uniklinikum Essen) im Rahmen des Kooperationsprojektes HeliTec zur Verfügung gestellt.

### 2.2.3.16 SPR-Spektroskopie

Die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie) ist eine Methode zur Charakterisierung von molekularen Interaktionen. Hierbei wird ein Bindungspartner auf einer Goldoberfläche immobilisiert und der Analyt über diese Messzelle geströmt. Gleichzeitig wird von der anderen Seite der Metalloberfläche Licht eingestrahlt, wobei im Falle der Totalreflektion ein Teil der Lichtenergie als Oberflächenplasmon in die Oberfläche eindringt.

Der Energietransfer ist proportional zum Brechungsindex der Oberfläche, welcher durch deren Schichtdicke und Dichte beeinflusst wird. Interagiert ein Analyt mit dem immobilisierten Bindungspartner, so ändert sich auf Grund der Akkumulation von zusätzlichen Molekülen an der funktionalisierten Oberfläche der Brechungsindex des eingestrahnten Lichtes und damit auch der Reflexionswinkel proportional zur Masse der gebundenen Moleküle. Über die Messung der Änderung im Reflexionswinkel kann so in Echtzeit die Massenänderung durch Bindungsereignisse in einem Sensogramm dargestellt werden. Dabei wird das Oberflächenplasmonenresonanzsignal, ausgedrückt in Response Units (RU), gegen die Zeit aufgetragen.

In dieser Arbeit wurde die Methode dazu verwendet, um einen qualitativen Nachweis des VacA-Proteins aus *H. pylori* Kulturüberständen durchzuführen. Hierfür wurde ein CM5 Chip (Tabelle 24) verwendet, der auf seiner Goldoberfläche eine carboxymethylierte Dextranmatrix aufweist. Die Chip-Oberfläche wurde nach Herstellerangaben mit einem *Rabbit Anti Mouse*-Reagenz (*Capture Antibody*) kovalent funktionalisiert. Hierfür kamen das Amine Coupling Kit und das Mouse Antibody Capture Kit (Tabelle 24) zum Einsatz. Für die Messung wurde ein monoklonaler Maus IgG<sub>1</sub> VacA Antikörper (Tabelle 23) (*Detection Antibody*) auf eine finale Konzentration von  $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  in HBS-EP Puffer (Tabelle 21) verdünnt. Als Proben wurde jeweils 1 mL der filtrierten jeweiligen *H. pylori*-Flüssigkultur verwendet (2.2.1.3). Diese Proben wurden für die SPR-Messung 1:2 in HPS-EP Puffer verdünnt. Die SPR-Messung erfolgte mit einem Biacore™ T200 Instrument (Tabelle 25) bei einer Flussrate von  $30 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  bei 25°C mit HBS-EP als Laufpuffer, wobei die Immobilisierung des *Detection Antibody* an der Chip-Oberfläche in einem Signal von 185,0 RU resultierte. Als Kontrolle wurde die jeweilige Probe über eine Referenzoberfläche ohne *Detection Antibody* injiziert, um mögliche Wechselwirkungen des Analyten mit dem *Capture Antibody* festzustellen. Zwischen einzelnen Messzyklen für die untersuchten Proben wurden jeweils zwei Regenerationsschritte durchgeführt, um eine ausreichende *Baseline Recovery* von ca.  $\pm 5\%$  zu erreichen. Der Prozessablauf ist in Tabelle 11 dargestellt. Die Durchführung der SPR-Analytik erfolgte durch Holger Spiegel (Fraunhofer IME).

Tabelle 11: Prozessschritte SPR-Analyse

Schritt bzw. Injektion	Injektionszeit (sec)	Anzahl	Beschreibung
Regenerationslösung	45	1	Entfernung von Rückständen
<i>Detection Antibody</i>	180	1	Bindung mAB VacA an <i>Capture Antibody</i>
Probe ( <i>H. pylori</i> WT)	180	1	Bindung Analyt an <i>Detection Antibody</i>
Regenerationslösung	45	2	Entfernung Analyt und <i>Detection Antibody</i>
<i>Detection Antibody</i>	180	1	Bindung mAB VacA an <i>Capture Antibody</i>
Probe ( <i>H. pylori</i> HP3)	180	1	Bindung Analyt an <i>Detection Antibody</i>
Regenerationslösung	45	2	Entfernung Analyt und <i>Detection Antibody</i>
Probe ( <i>H. pylori</i> WT)	180	1	Interaktion Analyt mit Referenzoberfläche
Regenerationslösung	45	2	Entfernung Analyt
Probe ( <i>H. pylori</i> HP3)	180	1	Interaktion Analyt mit Referenzoberfläche
Regenerationslösung	45	2	Entfernung Analyt

Ein CM5-Chip wurde mit einem *Rabbit Anti Mouse*-Antikörper (*Capture Antibody*) funktionalisiert, um nachfolgend einen VacA-spezifischen monoklonalen Antikörper (mAB) zu binden. Dieser Antikörper wurde als *Detection Antibody* zum Nachweis des VacA-Proteins aus den Kulturüberständen von *H. pylori* Wildtyp (WT) und *H. pylori* HP3 ( $\Delta vacA$ ) verwendet. Als Kontrolle wurde die jeweilige Probe auf eine Referenzoberfläche ohne *Detection Antibody* injiziert.

## 2.2.4 Extraktions- und Chromatographie-Methoden

### 2.2.4.1 Extraktion von AI-1 aus Kulturüberständen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob *H. pylori* neben AI-2 auch AI-1 bildet. Hierfür wurde ein Protokoll angewendet, mit dem sich eventuell vorhandene AI-1 direkt aus dem filtrierten bakteriellen Kulturüberstand extrahieren lassen. Als Positivkontrolle wurde ein *Y. enterocolitica*-Stamm verwendet, da dieser Stamm die AI-1-Moleküle *N*-( $\beta$ -Ketocaproyl)-L-Homoserinlacton und *N*-Hexanoyl-L-Homoserinlacton bildet [119].

Für den Nachweis dieser AI-1 wurde *Y. enterocolitica* DSM 11503 (Tabelle 1) in Flüssigkultur angezogen. Hierfür wurde in einem 100 mL Schüttelkolben mit Schikane 100  $\mu$ L eines Glycerol-Stocks in 10 mL TSB-Medium (Tabelle 20) überführt und der Ansatz aerob bei 28°C und 160 rpm für 24 h inkubiert. Neben der *Y. enterocolitica*-Kultur wurde eine weitere Schüttelkolbenkultur von *H. pylori* DSM 21031 angesetzt (2.2.1.3), wobei das verwendete HP-Medium 2 (Tabelle 20) im Schüttelkolben mit *H. pylori*-Zellen inokuliert wurde, sodass eine initiale OD<sub>600</sub> = 0,05 vorlag. Die Kultivierung erfolgte für 24 h unter mikroaerophilen Konditionen (2.2.1.3). Die Kulturüberstände wurden anschließend in beiden Fällen für 15 min bei 8000  $\times$  g zentrifugiert und die Überstände mittels 0,2  $\mu$ m Filter filtriert.

Mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion sollten vorhandene AI-1 aus den Kulturüberständen extrahiert werden. Hierfür wurden 1,2 mL Probe mit 400  $\mu$ L AI-1 Extraktionslösung (Tabelle 21) für 1 min auf einem Vortexer gemischt. Die Ansätze wurden anschließend für 1 min bei

11.000  $\times$  g zentrifugiert. Die obere organische Phase wurde gesammelt und aus der wässrigen Phase wurde wie oben beschrieben erneut extrahiert. Der Extraktionsprozess wurde insgesamt fünf Mal wiederholt. Das gesammelte Lösungsmittel der jeweiligen Probe wurde anschließend mittels dem Vakuumkonzentrator (Tabelle 25) für bis zu 2 h zentrifugiert, bis keine Lösungsmittelrückstände mehr vorhanden waren. Die Rückstände wurden anschließend in 200  $\mu$ L Acetonitril gelöst, in eine Kurzgewindeflasche überführt und mit einem entsprechenden Deckel (Tabelle 24) verschraubt. Die Proben wurden unmittelbar für eine Messung mittels Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektroskopie-Kopplung (LC-MS/MS) eingesetzt (2.2.4.4).

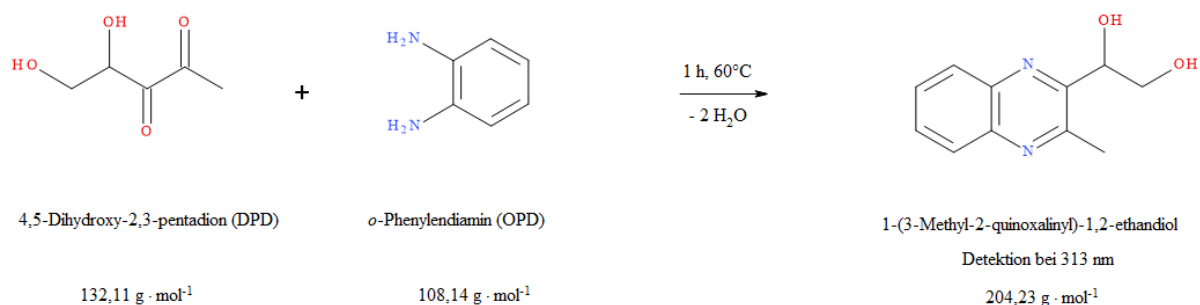
### 2.2.4.2 Extraktion und Derivatisierung von AI-2 aus Kulturüberständen

Das Enzym LuxS katalysiert in *H. pylori* die Synthese des bakteriellen Botenstoffs AI-2 [78]. In dieser Arbeit sollte ein Knockout-Stamm entwickelt werden, welcher nicht mehr in der Lage ist, das Enzym zu exprimieren und folglich eine signifikante Reduktion der AI-2-Konzentration im Kulturüberstand aufweist. Zur quantitativen AI-2 Bestimmung sollten ausgehend von Flüssigkultur-Überständen des Wildtyp- und Knockout-Stamms Extraktionen durchgeführt werden.

Der Nachweis von AI-2 erfolgt indirekt über die Molekülvorstufe DPD. Die Derivatisierung wurde mittels *o*-Phenylendiamin (OPD) durchgeführt, wobei die Ketogruppen des DPDs mit den Aminofunktionalitäten des OPDs ein Chinoxalin-Derivat ausbilden und das stabile Molekül 1-(3-Methyl-2-chinoxaliny)-1,2-ethandiol (MQED) mit einem Molekulargewicht von 204,23  $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$  entsteht (Abbildung 4). Dieses lässt sich mittels LC-MS/MS detektieren.

Zu Beginn wurden die Stämme *H. pylori* DSM 21031 und HP2 für 24 h in Schüttelkolbenkulturen kultiviert (2.2.1.3). Pro Stamm wurden jeweils drei Kulturen erstellt. Die Kultivierung erfolgte an drei unabhängigen Tagen, sodass pro Stamm final neun Kulturen vorlagen. Ausgehend von dem jeweiligen Kolben wurden 2 mL der Kultur am jeweiligen Tag bei 11.000  $\times$  g zentrifugiert und der Überstand 0,2  $\mu$ m filtriert. Die Überstände wurden bis zum Tag der Messung bei -80°C gelagert und am Tag der Messung auf Eis aufgetaut. Für die indirekte Quantifizierung von AI-2 wurde eine Kalibriergerade erstellt. Hierfür wurden aus einer 100  $\mu$ M DPD-Stammlösung (Tabelle 21) acht Kalibrierlösungen mit Konzentrationen zwischen 0,5 und 100  $\mu$ M in PBS (1x) (Tabelle 21) hergestellt und mit einer 100 mM OPD-Stammlösung (Tabelle 21) derivatisiert. Als Proben wurden 0,2  $\mu$ m filtrierte Kulturüberstände von *H. pylori* DSM 21031 und HP2 verwendet sowie PBS (1x) und 0,2  $\mu$ m filtriertes HP-Medium als Negativkontrollen. Zusätzlich wurde in einen Kulturüberstand von *H. pylori* HP2

zur Kontrolle DPD mit einer finalen Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  formuliert (Positivkontrolle). Weiterhin wurde in einen Kulturüberstand von *H. pylori* DSM 21031 final 10  $\mu\text{M}$  DPD formuliert. 50  $\mu\text{L}$  der verdünnten Standards, Kulturüberstände und der Positivkontrollen wurden mit jeweils 50  $\mu\text{L}$  OPD-Stammlösung gemischt. Die Derivatisierungsreaktion erfolgte für 1 h bei RT unter Lichtausschluss. Die Ansätze wurden für 10 sec auf dem Vortexer gemischt und für 1 min bei 16.000  $\times g$  zentrifugiert. Die Reaktion erfolgte für die Kulturproben in Dreifach-, für die Standards in Zweifach- und für die Positivkontrollen in Einfachbestimmung. Die Extraktion der derivatisierten AI erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurden für jede zu untersuchende Probe in je einem 5 mL Reaktionsgefäß 322 mg Natriumacetat Trihydrat und 800 mg wasserfreies Magnesiumsulfat eingewogen und in 1 mL MilliQ gelöst. Nach erfolgter Derivatisierungsreaktion wurden die jeweiligen 100  $\mu\text{L}$  Ansätze mit 900  $\mu\text{L}$  MilliQ verdünnt und mittels Vortexer gemischt. Danach wurden die Proben in die vorbereiteten 5 mL Reaktionsgefäße überführt und die Ansätze auf Stufe 10 des Vortexers für 15 sec gemischt. Mit einer Multipipette wurden zu jedem Ansatz 2 mL Acetonitril + 1 % Ameisensäure gegeben und für 1 min auf einem Vortexer bei Stufe 10 gemischt. Nachfolgend wurden die Proben für 5 min bei 3.000  $\times g$  zentrifugiert. Jeweils 1 mL der oberen organischen Phase wurde in ein DisQuE™ Reaktionsgefäß (Tabelle 24) überführt und für 30 sec auf einem Vortexer gemischt. Danach wurden die Extrakte für 1 min bei 10.000  $\times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels 1 mL Spritze und einer Kanüle abgenommen, mit einem 0,2  $\mu\text{m}$  Filter filtriert und in eine 1,5 mL Kurzgewindeflasche mit Deckel überführt. Die Proben wurden bis zur Messung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.



**Abbildung 4: Derivatisierung von DPD zu MQED**

4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion (DPD) wird zusammen mit *o*-Phenylendiamin (OPD) inkubiert. Unter Abspaltung von zwei Wassermolekülen bilden sich zwischen den Aminogruppen des OPDs und den Keton-Gruppen des DPDs ein stabiles Chinoxalin-Derivat aus, welches bei 313 nm detektiert werden kann. Abbildung angepasst: Alexander Croon, Fraunhofer IME.

### 2.2.4.3 Extraktion von AI-3 aus Kulturüberständen

Neben AI-1 ist die Bildung von AI-3 durch *H. pylori* ebenfalls nicht in der Literatur beschrieben. Entsprechend sollte im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden, ob *H. pylori* neben AI-2 auch andere AI-Typen bildet, damit perspektivisch auf alternative AI-regulierbare Expressionssysteme zurückgegriffen werden kann. Die Extraktion eventuell vorhandener AI-3 erfolgte direkt aus dem filtrierten bakteriellen Kulturüberstand. Als Positivkontrolle wurden verfügbare Standards in *H. pylori*-Kulturmedium formuliert. Für eine Flüssigkultur wurden 25 mL HP-Medium in einem 100 mL Schüttelkolben mit *H. pylori* DSM 21031 inokuliert, sodass sich eine initiale  $OD_{600} = 0,05$  ergab. Die Kultur wurde für 24 h wie unter 2.2.1.4 beschrieben inkubiert. Der Kulturüberstand wurde nachfolgend für 30 min bei  $4500 \times g$  zentrifugiert und die Überstände mittels  $0,2 \mu\text{m}$  Filter filtriert. Für die Referenzmessungen standen sechs AI-3-Standards mit bekannter Konzentration von  $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  sowie zwei AI-3-Standards (Tabelle 22), 1:10 in Methanol verdünnt, mit unbekannter Konzentration zur Verfügung. Alle Standards wurden freundlicherweise durch Prof. Crawford (Yale University, Westhafen, US) zur Verfügung gestellt. Für eine Positivkontrolle wurde ein AI-3-Standardmischung bestehend aus acht AI-3-Molekülen (Tabelle 22) erstellt. Hierfür wurden  $50 \mu\text{L}$  der jeweiligen Standards mit  $100 \mu\text{L}$  Methanol gemischt. Die Standards mit bekannter Konzentration lagen final mit einer Konzentration von  $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  und die Standards mit unbekannter Konzentration 1:100 verdünnt vor. Jeweils  $20 \mu\text{L}$  dieser AI-3-Standardmischung wurde nachfolgend verwendet und in 5 mL HP-Medium formuliert (Positivkontrolle).

Die Isolierung von AI-3 aus dem Kulturüberstand erfolgte mittels Festphasenextraktion. Hierfür wurde eine BAKERBOND spe™ C18 SPE-Säule (Tabelle 24) mit 3 mL Methanol und anschließend 3 mL Wasser konditioniert. Nachfolgend wurden 5 mL des Kulturüberstandes, Kulturmediums (Negativkontrolle) oder der Positivkontrolle auf die Säule geladen. Anschließend wurden die Säulen mit 3 mL 5 % Methanol (Tabelle 21) gewaschen und final drei Mal mit 2 mL Acetonitril in ein 5 mL Reaktionsgefäß eluiert. Das Beladen der Säule mit den jeweiligen Proben erfolgte ohne Vakuum im Gravitationsfluss. Alle anderen Beladungsschritte erfolgten mit Vakuum unter Verwendung einer Wasserstrahlpumpe. Das trübe Eluat wurde für 10 min bei  $3000 \times g$  zentrifugiert, mittels  $0,2 \mu\text{m}$  Spritzenfilter ROTILABO® Polyvinylidenfluorid (Tabelle 24) filtriert und das danach klare Filtrat mittels Vakuumkonzentrator (Tabelle 25) eingedampft. Final wurden die Proben in  $200 \mu\text{L}$  gelöst, mittels  $0,2 \mu\text{m}$  Sartorius® Claristep Filter (Tabelle 24) filtriert und in eine Kurzgewindeflasche mit Deckel überführt. Die Proben wurden bis zur Messung am gleichen Tag bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Die Durchführung der Extraktion erfolgte durch Alexander Croon (Fraunhofer IME).

#### 2.2.4.4 Qualitativer Nachweis von AI-1 mittels LC-MS/MS

*N*-Acyl-L-Homoserinlactone sind kleine diffusionsfähige Signalmoleküle Gram-negativer Bakterien, die aus einem charakteristischen fünfgliedrigen Lactonring und einer variablen linearen Acylgruppe bestehen. Aufgrund des charakteristischen Lactonrings wurde eine *Untargeted Metabolomics* Methode verwendet, welche diesen charakteristischen Lactonring als Produktion filtert.

Für die Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC) wurde eine Gerätekombination aus dem Ultimate™ 3000 HPLC, Ultimate™ 3000 Mehrfachwellenlängen-Detektor, Ultimate™ 3000 Säulenthermostat TCC-3000, Ultimate™ LPG-3400 RS Quarternäre Schnelltrennungspumpe und Ultimate™ WPS-3000 TBFC MTP Autosampler mit Fraktionssammler (Tabelle 25) gewählt. Die Durchführung der LC-MS/MS-Analytik erfolgte unter folgenden Konditionen und dem in Tabelle 12 dargestellten Trennverfahren.

#### UHPLC:

- Autosamplertemperatur: 10°C
- Injektionsvolumen: 10 µL
- Injektionsart: µL Pickup (Tansportsolvens: Mobile Phase A1)
- Säule: Ascentis® Express C18, 2,7µm, 150 x 2,1 mm, 90 Å
- Säulentemperatur: 30°C
- Flussrate: 0,2 mL · min<sup>-1</sup>
- Mobile Phase A1: 5 % (v/v) Methanol + 0,1 % (v/v) Ameisensäure
- Mobile Phase B1: 95 % (v/v) Methanol + 0,1 % (v/v) Ameisensäure

**Tabelle 12: Trennverfahren der AI-1 mittels UHPLC**

Zeit (min)	Mobile Phase B1 (%)	Prozessschritt
-3–0	0	Äquilibrierung
0–3	0	Isokratisch
3–18	0–100	Gradient
18–21	100	Isokratisch
21–22	100–0	Gradient
22–25	0	Isokratisch

Die Analyten wurden nachfolgend mittels MS/MS mit einem Triple-Quadrupol Massenspektrometer (QqQ) analysiert. Hierzu wurde der Ausgang der UHPLC mit der Electrospray Ionisationsquelle (ESI-Quelle) des QqQ verbunden und nachfolgend wurden die

Moleküle in der ESI-Quelle ionisiert. Für die MS/MS Messung wurde das TSQ Quantum Ultra (Tabelle 25) eingesetzt.

### ESI-QqQ Methode:

- Modus: *Parent Ion Scan*
- *Positive Ionization Mode*
- *Spray Voltage: 5000 V*
- *Sheath Gas Pressure: 40 Arbitrary Units (AU)*
- *Ion Sweep Gas: 0 AU*
- *Auxiliary Gas Pressure: 45 AU*
- Transferkapillartemperatur: 350°C
- *Product Ion: m/z 102,1*
- Kollisionsenergie: 10 V
- *Scan Range m/z 100–1500*
- *Scan Time: 2 s*
- Mass spectrometry Detection window: 3–24 min

Die Durchführung der LC-MS/MS-Analytik erfolgte durch Alexander Croon (Fraunhofer IME).

### **2.2.4.5 Quantifizierung von AI-2 mittels LC-MS/MS**

Der indirekte Nachweis von AI-2 über das derivatisierte DPD-Molekül MQED erfolgte mittels LC-MS/MS unter den nachfolgenden Konditionen und dem in Tabelle 13 dargestellten Trennverfahren. Für die Durchführung der LC-MS/MS wurde die Gerätekombination gewählt, welche bereits unter 2.2.4.4 beschrieben wurde.

### UHPLC:

- Autosamplertemperatur: 10°C
- Injektionsvolumen: 10 µL
- Injektionsart: Partial Injection
- Säule: Ascentis® Express C18, 2,7µm, 150 x 2,1 mm, 90 Å
- Säulentemperatur: 30°C
- Flussrate: 0,3 mL · min<sup>-1</sup>
- Mobile Phase A2: 5 % (v/v) Acetonitril + 0,1 % (v/v) Ameisensäure
- Mobile Phase B2: 95 % (v/v) Acetonitril + 0,1 % (v/v) Ameisensäure

Tabelle 13: Trennverfahren des derivatisierten DPD mittels UHPLC

Zeit (min)	Mobile Phase B (%)	Prozessschritt
-2–0	0	Äquilibriumierung
0–3	0	Isokratisch
3–13	0–100	Gradient
13–15	100	Isokratisch
15–15,5	100–0	Gradient
15,5–18	0	Isokratisch

Die Analyten wurden mittels UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 220 nm, 260 nm, 280 nm, 313 nm detektiert, wobei letztere Wellenlänge für die Detektion des derivatisierten DPDs verwendet wurde. Nachfolgend wurden die Analyten mittels MS/MS mit einem QqQ analysiert. Hierzu wurde der Ausgang der UHPLC mit der ESI-Quelle des QqQ verbunden und nachfolgend wurden die Moleküle in der ESI-Quelle ionisiert. Anschließend wurden im ersten Quadrupol alle Ionen mit dem  $m/z$  des *Parent Ion* gefiltert. Nachfolgend kollidierten diese im zweiten Quadrupol mit Argon-Atomen, sodass charakteristische Produktionen entstanden (Tabelle 14), welche im Dritten Quadrupol gefiltert wurden und nachfolgend auf den Detektor trafen. Die ESI-QqQ-Methode wurde unter den nachfolgenden Konditionen durchgeführt. Die Durchführung der LC-MS/MS-Analytik erfolgte durch Alexander Croon (Fraunhofer IME).

ESI-QqQ-Methode:

- Modus: *Selected Reaction Monitoring*
- *Positive Ionization Mode*
- *Spray Voltage*: 5000 V
- *Sheath Gas Pressure*: 40 AU
- *Ion Sweep Gas*: 0 AU
- *Auxiliary Gas Pressure*: 45 AU
- Kapillartemperatur: 350°C
- *Tube Lens*: 83
- *Parent Ion*:  $m/z$  205,1
- Transferkapillartemperatur: 350°C

**Tabelle 14: Produktmassen des DPD-Derivats**

Produktmassen $m/z$	Kollisionsenergie (V)
77,0	44
144,3	23
158,3	24
159,1	18
187,2	12

**2.2.4.6 Qualitativer Nachweis von AI-3 mittels LC-MS/MS**

Der Nachweis von Pyrazinon-Metaboliten erfolgte mittels LC-MS/MS, wobei die Gerätekombination der LC-MS/MS aus Kapitel 2.2.4.4 verwendet wurde. Hierfür wurden die nachfolgenden UHPLC-Parameter und das in Tabelle 15 dargestellte Trennverfahren verwendet.

UHPLC:

- Autosamplertemperatur: RT
- Injektionsvolumen: 10  $\mu$ L
- Injektionsart:  $\mu$ L Pickup (Tansportsolvens: Mobile Phase A1)
- Säule: Ascentis® Express C18, 2,7 $\mu$ m, 150 x 2,1 mm, 90 Å
- Säulentemperatur: 30°C
- Flussrate: 0,3 mL · min<sup>-1</sup>
- Mobile Phase A2: 5 % (v/v) Acetonitril + 0,1 % (v/v) Ameisensäure
- Mobile Phase B2: 95 % (v/v) Acetonitril + 0,1 % (v/v) Ameisensäure

Tabelle 15: Trennverfahren der AI-3 mittels UHPLC

Zeit (min)	Mobile Phase B2 (%)	Prozessschritt
-2–0	0	Äquilibration
0–2	0	Isokratisch
2–18	0–100	Gradient
18–20	100	Isokratisch
20–21	100–0	Gradient
21–25	0	Isokratisch

Die Analyten wurden nachfolgend mittels MS/MS mit einem QqQ analysiert. Hierzu wurde der Ausgang der UHPLC mit der ESI-Quelle des QqQ verbunden und nachfolgend wurden die Moleküle in der ESI-Quelle ionisiert.

ESI-QqQ Methode:

- Modus: *Single Reaction Monitoring*
- *Positive Ionization Mode*
- *Spray Voltage: 3000 V*
- *Sheath Gas Pressure: 35 AU*
- *Ion Sweep Gas: 0 AU*
- *Auxiliary Gas Pressure: 30 AU*
- Kapillartemperatur: 350°C
- *Mass Spectrometry Detection Window: 3–22 min*

Für die jeweiligen AI-3-Standards wurden zu Beginn durch Alexander Croon (Fraunhofer IME) entsprechende *Scan Events* erstellt (Daten nicht gezeigt), welche die optimierten Einstellungen zur Detektion eines jeweiligen AI-3-Standards beschreiben. Hierfür wurde die Referenzsubstanz (Tabelle 22) direkt in die ESI-Quelle injiziert und nachfolgend mittels MS/MS mit einem QqQ analysiert. Die Durchführung der LC-MS/MS-Analytik erfolgte durch Alexander Croon (Fraunhofer IME).

**2.2.4.7 Enzymatische Hydrolyse der AMPs**

Im menschlichen Magen liegt das Verdauungsenzym Pepsin vor, welches Proteine und Peptide hydrolysiert. Aufgrund der Spezifität des Enzyms ist es sehr wahrscheinlich, dass auch die in dieser Arbeit verwendeten AMPs sensitiv gegenüber Pepsin sind, womit ein Verlust der

antimikrobiellen Aktivität einhergehen würde. Die nachfolgende Methode zur Hydrolyse der AMPs durch Pepsin orientierte sich an den Arbeiten von Wang *et al.* [120].

In der Reaktion wurden pro 1 µg AMP 10 U Pepsin eingesetzt. Hierfür wurden 50 µL des jeweiligen AMPs (Tabelle 2) verdünnt in Reaktionslösung (1x) (Tabelle 21) mit 107 µL einer Pepsin-Stammlösung (Tabelle 21) und 43 µL Reaktionslösung (5x) (Tabelle 21) gemischt. Aufgrund der geringen Konzentration der kommerziellen Nisin A Stammlösung von  $0,959 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  wurden hier 104,25 µL anstelle der sonst verwendeten 50 µL eingesetzt. Die Ansätze wurden bei 37°C und 200 rpm auf dem Thermoschüttler MKR13 (Tabelle 25) für 60 min inkubiert (Tabelle 25). Die Inkubationszeit für die AMPs Buf IIIb und BAMP wurde zusätzlich auf 24 h erweitert, da diese Peptide vollständig bzw. bedingt resistent gegenüber Pepsin sind [121, 122]. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 70 µL einer 0,7 M Natriumcarbonat-Lösung (Tabelle 21) gestoppt. Für jedes AMP wurde ein Kontrollstandard erstellt, bei dem das Volumen der Pepsin-Stammlösung durch Reaktionslösung (1x) ersetzt wurde. Zudem wurde als Kontrolle Pepsin durch direkte Zugabe der Natriumcarbonat-Lösung inhibiert, bevor das jeweilige AMP zum Ansatz hinzugefügt wurde. Nach erfolgter Inkubation wurden 100 µL des jeweiligen Reaktionsansatzes in eine Kurzugwindeflasche mit Mikroinsert (Tabelle 24) überführt und mit einem entsprechenden Deckel verschlossen. Die Durchführung der LC-MS-Analytik erfolgte unter Verwendung der Gerätekombination, welche in 2.2.4.4 beschrieben wurde, und unter den nachfolgenden Konditionen und dem in Tabelle 16 dargestellten Trennverfahren.

### UHPLC:

- Autosamplertemperatur: 10°C
- Injektionsvolumen: 10 µL oder 21 µL für Nisin A
- Injektionsart: µL Pickup (Transportsolvens: Mobile Phase A1)
- Säule: Ascentis<sup>®</sup> Express C18, 2,7µm, 150 x 2,1 mm, 90 Å
- Säulentemperatur: 30°C
- Flussrate:  $0,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$
- Mobile Phase A1: 5 % (v/v) Methanol + 0,1 % (v/v) Ameisensäure
- Mobile Phase B1: 95 % (v/v) Methanol + 0,1 % (v/v) Ameisensäure

Tabelle 16: Trennverfahren für Pepsin hydrolysierte AMPs mittels UHPLC

Zeit (min)	Mobile Phase B1 (%)	Prozessschritt
-3–0	0	Äquilibrierung
0–3	0	Isokratisch
3–30	0–100	Gradient
30–35	100	Isokratisch
35–40	100–0	Gradient
40–45	0	Isokratisch

Die Analyten wurden mittels UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 214 nm, 260 nm und 280 nm detektiert und im *Full Scan*-Modus nachfolgend mittels MS analysiert. Hierzu wurde der Ausgang der UHPLC mit der ESI-Quelle des QqQ verbunden und nachfolgend wurden die Moleküle in der ESI-Quelle ionisiert.

MS:

- Modus: *Full Scan*  $m/z$  20–1500
- *Positive Ionization Mode*
- *Spray Voltage*: 3000 V
- *Sheath Gas Pressure*: 35 AU
- *Ion Sweep Gas*: 0 AU
- *Auxiliary Gas Pressure*: 30 AU
- Kapillartemperatur: 350°C
- *Scan Time* (s): 0,423
- Q3 Peak Width FWHM: 0,7
- MS Datenaufnahme: 3–42 min; Nach 3 min wurde das Ventil auf MS Detektion geschaltet und für die letzten 3 min zurückgeschaltet

Die Durchführung der LC-MS-Analytik erfolgte durch Alexander Croon (Fraunhofer IME).

**2.2.5 Daten Evaluation und Visualisierung**

Die Auswertung von Messdaten erfolgte mittels Excel (Tabelle 26) und die statistische Evaluation sowie graphische Darstellung mit GraphPad Prism (Tabelle 26).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Identifizierung wirksamer AMPs

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche AMPs eine antimikrobielle Wirkung gegenüber *H. pylori* zeigen, um diese nachfolgend für den Trojaner-basierten Therapieansatz verwenden zu können. Hierzu wurden zunächst auf Basis einer Literaturrecherche Publikationen, Patente und die *Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides* (Tabelle 26) nach *H. pylori* wirksamen AMPs durchsucht und 49 AMPs identifiziert. Die Anzahl der in dieser Arbeit näher zu betrachtenden AMPs wurde durch die nachfolgenden Kriterien reduziert:

1. Die beschriebene minimale Hemmkonzentration (MHK) sollte möglichst  $< 16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  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.

Auf Basis dieser Kriterien ergaben sich für diese Arbeit elf näher zu prüfende AMPs (Tabelle 2), wobei eines der identifizierten AMPs, Nisin A, über mehrere posttranslationale Modifikationen verfügt (2.1.3). Neben diesen AMP-Kandidaten wurden zusätzlich zwei weitere AMPs, Buf IIIb und BAMP, mitgeführt, deren Auswahl nicht den genannten Kriterien unterlag. Diese AMPs sind vollständig oder bedingt resistent gegenüber dem im Magen vorliegende Enzym Pepsin [121, 122]. Eine vorzeitige Degradierung durch eine enzymatische Hydrolyse würde für spätere therapeutische Anwendungen im Magen die antimikrobielle Aktivität beeinflussen. Da die Peptide Buf IIIb und BAMP nach aktuellem Stand der Literatur bisher noch nicht gegenüber *H. pylori* getestet wurden, sollten im Rahmen dieser Arbeit detaillierte Versuche zu ihrer Wirksamkeit gegen *H. pylori* erfolgen.

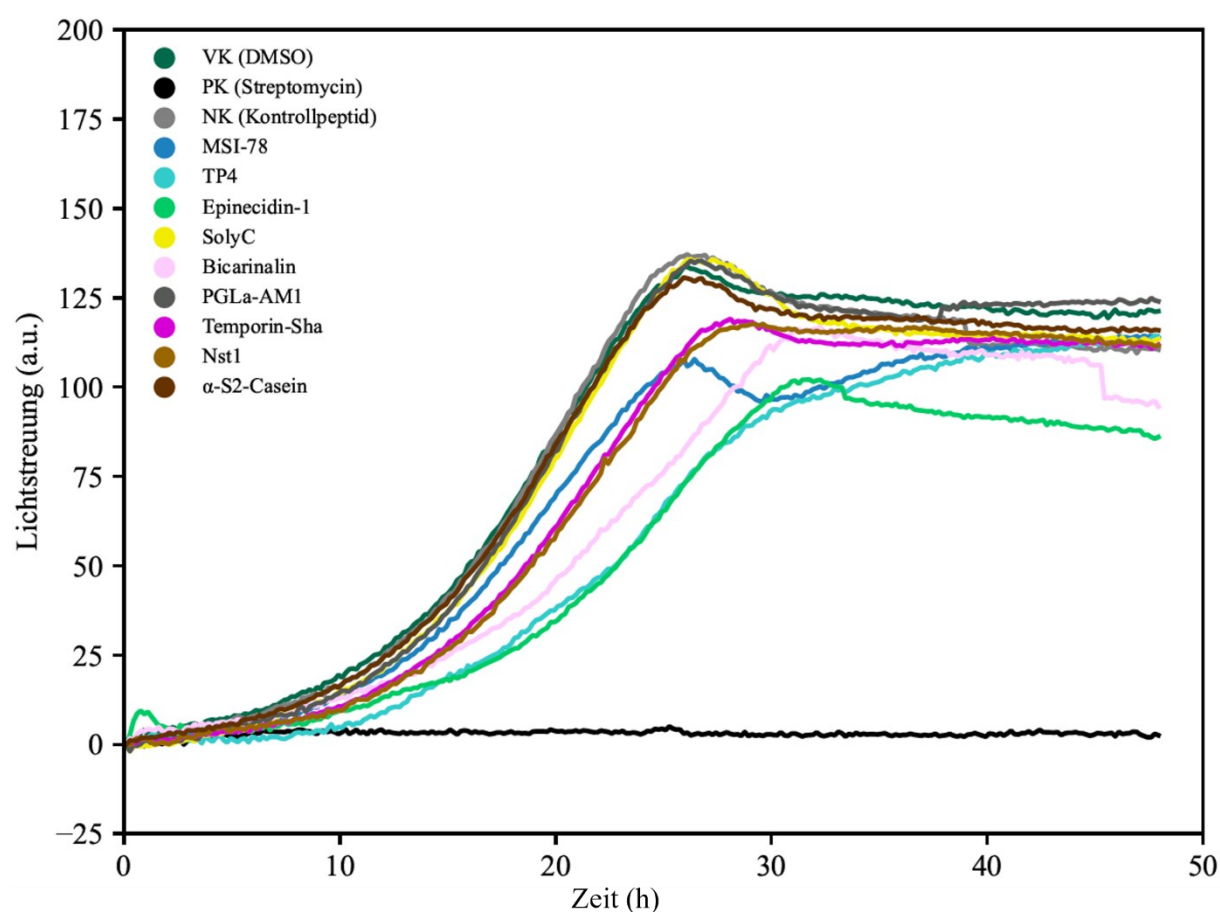
##### 3.1.1 Wirksamkeitstests der AMPs gegenüber *H. pylori* im BioLector-System

Der Wirksamkeitsnachweis der AMPs gegenüber *H. pylori* erfolgte durch die Aufnahme von Wachstumskinetiken. Hierfür wurden die Kulturen mit  $10 \mu\text{M}$  pro Peptid versetzt und unter mikroaerophilen Bedingungen bei  $37^\circ\text{C}$  für 48 h im 48-Well-MTP Format im BioLector® Pro-System (2.2.1.4) kultiviert. Für die Positivkontrolle wurde das Antibiotikum Streptomycin

eingesetzt. Als Vehikelkontrolle wurde das entsprechende Lösungsmittel der AMPs (Tabelle 2) verwendet, um den Einfluss des Lösungsmittelanteils auf das bakterielle Wachstum zu beurteilen. Weiterhin wurde als Negativkontrolle ein Peptid mit einer zufällig ausgewählten Aminosäuresequenz mitgeführt, welches keine antimikrobielle Wirkung aufweisen soll, und nachfolgend unter dem Namen „Kontrollpeptid“ verwendet wird (Tabelle 2). Streptomycin und alle AMPs mit Ausnahme von LL-37 und Nisin A wurden in DMSO gelöst. Nisin A wurde in HCl und LL-37 in DPBS gelöst. Die Kultivierung von *H. pylori* ohne Einfluss von Lösungsmittel zeigte, dass die Zellen sich anfangs für ca. 10 h in einer Lag-Phase befanden und nachfolgend in die exponentielle Phase übergangen (Abbildung 5, Abbildung 6). Ab ca. 25 h erreichten die Kulturen die stationäre Phase und gingen anschließend in die Absterbe-Phase über (Abbildung 5, Abbildung 6). Die Kinetiken der Vehikelkontrollen unter Einfluss von DMSO und HCl zeigten relativ zur Kinetik der Wachstumskontrolle ohne Lösungsmittel kaum einen Unterschied hinsichtlich des Kurvenverlaufs (Abbildung 6). Ebenso zeigte das „Kontrollpeptid“, welches als Negativkontrolle verwendet wurde, keinen sichtbaren Unterschied im Wachstumsverhalten zur Vehikelkontrolle mit DMSO (Abbildung 5, Abbildung 6). Als Positivkontrolle wurde das Antibiotikum Streptomycin mit einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  mitgeführt, welches das Wachstum von *H. pylori* vollständig hemmte (Abbildung 5, Abbildung 6). Die AMPs  $\alpha$ -S2-Casein, SolyC sowie die laut Literatur beschriebenen Pepsin-resistenten AMPs BAMP und Buf IIIb beeinflussten die Vermehrung von *H. pylori* nicht (Abbildung 5, Abbildung 6). Weiterhin hatten die AMPs MSI-78, Temporin-Sha und dessen Derivat Nst1 einen geringen Effekt auf das Wachstum (Abbildung 5). Darüber hinaus zeigten die Peptide Bicarinalin, Epinecidin-1 und TP4 eine moderate antimikrobielle Wirkung, was relativ zur Vehikelkontrolle durch eine zeitlich verschobene und leicht abgeflachte exponentielle Phase im Kurvenverlauf sichtbar wird (Abbildung 5). Im Vergleich dazu wiesen die Peptide LL-37 und Nisin A eine hohe antimikrobielle Wirksamkeit auf (Abbildung 6). Zu Beginn der Kultivierung ähnelte das Wachstum von *H. pylori* unter Einfluss von LL-37 dem der Vehikelkontrolle. Allerdings wurde das Wachstum ab ca. 20 h in der frühen exponentiellen Phase gehemmt und anschließend stellte sich eine stationäre Phase ein (Abbildung 6). Insgesamt reduzierte LL-37 das bakterielle Wachstum nach 48 h bei der getesteten Konzentration relativ zur Vehikelkontrolle um ca. 80 %. Die Kultivierung des Stamms unter dem Einfluss von Nisin A führte dazu, dass eine stark abgeflachte und zeitlich verschobene exponentielle Phase sichtbar war, wobei die Kinetik nach ca. 42 h in eine stationäre Phase übergang. Relativ zur entsprechenden Vehikelkontrolle wurde das Wachstum nach 48 h um ca. 50 % bei der getesteten Konzentration gehemmt (Abbildung 6). Keines der

AMPs führte zu einer vollständigen Hemmung des Wachstums wie die Positivkontrolle (Abbildung 5, Abbildung 6). Zur Übersicht wurden die Daten ohne Standardabweichung dargestellt (Abbildung 5, Abbildung 6) und die Ergebnisse mit Standardabweichung dem Anhang beigelegt (Abbildung 24, Abbildung 25).

Zusammenfassend erwiesen sich unter den verwendeten AMPs LL-37 und Nisin A als die effektivsten Kandidaten zur Eradizierung von *H. pylori*, weshalb diese nachfolgend näher hinsichtlich ihrer dosisabhängigen Wirkungsweise gegenüber diesem Bakterium untersucht werden sollten.



**Abbildung 5: *H. pylori* Wachstumskinetiken unter Einfluss unterschiedlicher AMPs - Teil 1**

*H. pylori* DSM 21031 wurde für 48 h im BioLector<sup>®</sup> 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. Da alle AMPs in DMSO gelöst vorlagen, wurde eine entsprechende Vehikelkontrolle (VK) mit DMSO mitgeführt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten jeweils durchgeführt in drei technischen Replikaten ( $n = 3$ ). a.u. = *Arbitrary Unit*.

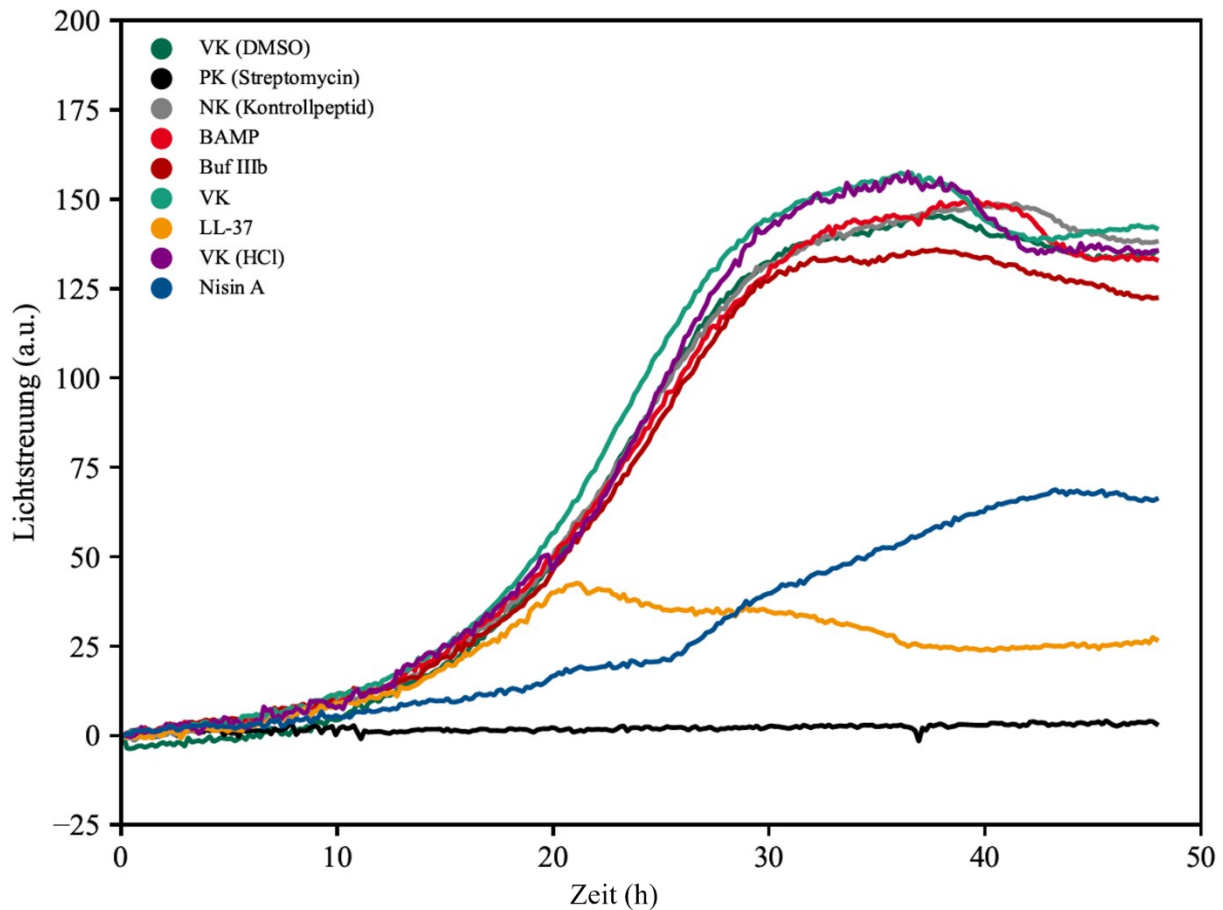


Abbildung 6: *H. pylori* Wachstumskinetiken unter Einfluss unterschiedlicher AMPs - Teil 2

*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 die Peptide BAMP und Buf IIIb wurde eine Vehikelkontrolle (VK) mit DMSO und für Nisin A 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 von drei unabhängigen Experimenten jeweils durchgeführt in drei technischen Replikaten ( $n = 3$ ). a.u. = *Arbitrary Unit*.

### 3.1.2 Aufnahme von Dosis-Wirksamkeitskurven für LL-37 und Nisin A

Da sich LL-37 und Nisin A unter den getesteten AMPs als besonders wirksam erwiesen hatten (3.1.1), wurde für beide AMPs die  $IC_{50}$  anhand von Dosis-Wirksamkeitskurven bestimmt (2.2.1.5). Für das AMP LL-37 wurde ein  $IC_{50} \approx 12 \mu\text{M}$  (Abbildung 7) und für Nisin A ein  $IC_{50} \approx 11 \mu\text{M}$  (Abbildung 8) errechnet. Eine fast vollständige eradizierende Wirkung von *H. pylori* wurde bei einer Konzentration  $\geq 50 \mu\text{M}$  für LL-37 (Abbildung 7) und  $\geq 25 \mu\text{M}$  für Nisin A (Abbildung 8) erzielt. Der Einfluss des Lösungsmittels (Vehikelkontrolle) auf das bakterielle Wachstum zeigte im Verhältnis zur antimikrobiellen Wirkung von Nisin A nur eine untergeordnete inhibitorische Wirkung. Lediglich eine höhere Lösungsmittel-Konzentration von 7 mM HCl, welche bei einer Peptidkonzentration von  $100 \mu\text{M}$  vorliegt, führte zur Inhibierung des bakteriellen Wachstums auf ca. 75 % (Abbildung 8). Um die Absorption des

AMPs mit zunehmender Peptidkonzentration zu berücksichtigen, wurde das Peptid in der jeweiligen Konzentration im verwendeten Kulturmedium gemessen. Aufgrund der limitierten Menge des AMPs LL-37 konnte nur in einem biologischen Versuch die Absorption mit zunehmender Peptidkonzentration gemessen werden. Daher ließ sich in den zwei nachfolgenden Replikaten die Peptidabsorption nicht mehr messen, weshalb die Messdaten der Peptidabsorption aus dem ersten Replikat für die Berechnung verwendet wurden.

Insgesamt zeigten beide AMPs einen  $IC_{50}$  im niederen Mikromolaren-Konzentrationsbereich (LL-37  $\approx 12 \mu\text{M}$ , Nisin A  $\approx 11 \mu\text{M}$ ) und beide AMPs sind in der Lage *H. pylori* fast vollständig zu eradizieren. Die Peptide LL-37 und Nisin A können daher für die Strategie der Expression eines AMPs im Trojaner in Betracht gezogen werden.

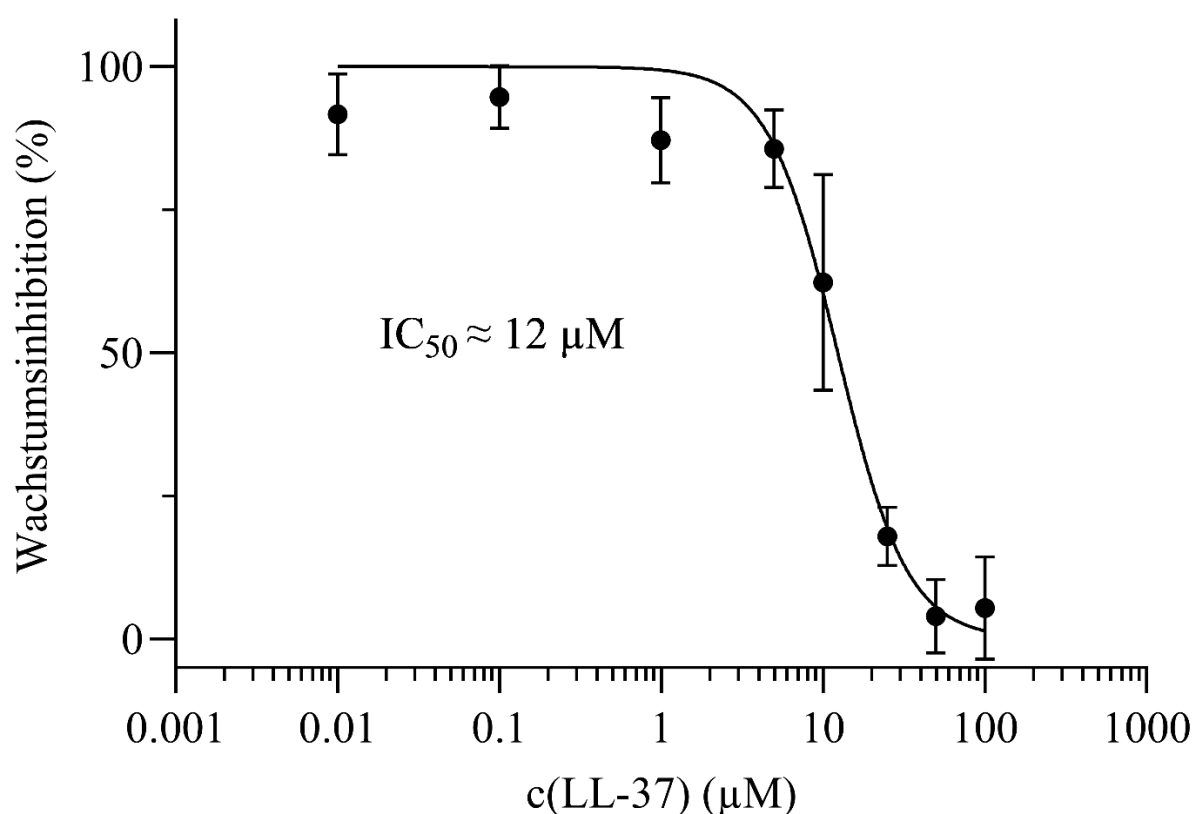


Abbildung 7: Dosis-Wirksamkeitskurve von LL-37 anhand von *H. pylori* DSM 21031

*H. pylori* DSM 21031 wurde unter Zugabe des antimikrobiellen Peptids LL-37 in unterschiedlichen Konzentrationen für 40 h unter mikroaerophilen Bedingungen kultiviert und die  $OD_{600}$  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 in DPBS gelöst wurde und dieses keinen Einfluss auf das bakterielle Wachstum zeigte, wurde keine Vehikelkontrolle mitgeführt. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten jeweils durchgeführt in drei technischen Replikaten ( $n = 3$ ).

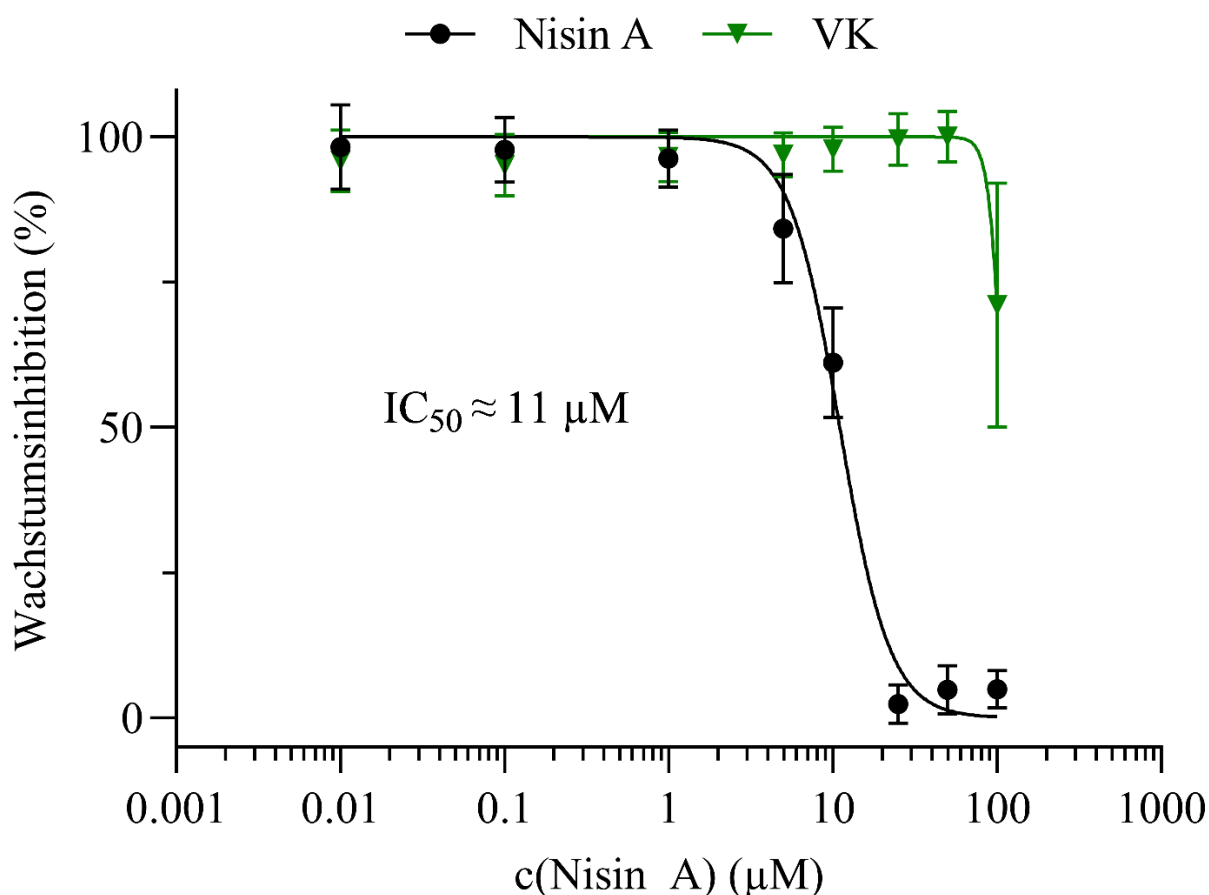


Abbildung 8: Dosis-Wirksamkeitskurve von Nisin A anhand von *H. pylori* DSM 21031

*H. pylori* DSM 21031 wurde unter Zugabe des antimikrobiellen Peptids Nisin A in unterschiedlichen Konzentrationen für 40 h unter mikroaerophilen Bedingungen kultiviert und die  $OD_{600}$  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 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 ( $n = 3$ ).

### 3.1.3 Zytotoxische Aktivität der AMPs gegenüber einer AGS-Zelllinie

Um die AMPs weiterhin auch hinsichtlich ihrer Toxizität für humane Anwendungen zu bewerten, wurden humane Magenschleimhautepithelzellen, nachfolgend AGS-Zellen genannt, mit den jeweiligen AMPs in einer definierten Stoffmengenkonzentration von 10  $\mu$ M äquimolar inkubiert (2.2.2.2). Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt. Aufgrund der gemessenen Standardabweichung des Fluoreszenzsignals wurde definiert, dass ein Einfluss auf die Viabilität vorliegt, wenn diese um  $> 15$  % reduziert wird. Bei der untersuchten Konzentration konnte für die Mehrheit der AMPs, einschließlich der Peptide LL-37 und Nisin A mit bekannter antimikrobieller Wirkung gegenüber *H. pylori*, keine zytotoxische Aktivität festgestellt werden. Ausschließlich die AMPs Epinecidin-1 ( $\sim 28$  % Viabilität) und TP4 ( $\sim 8$  % Viabilität) zeigten Einfluss auf die AGS-Zellviabilität. Sowohl die Kultivierung der AGS-Zellen mit dem

Detergens SDS als auch mit dem AMP Melittin als Positivkontrolle führten zur vollständigen Reduktion der Viabilität auf ca. 0 %.

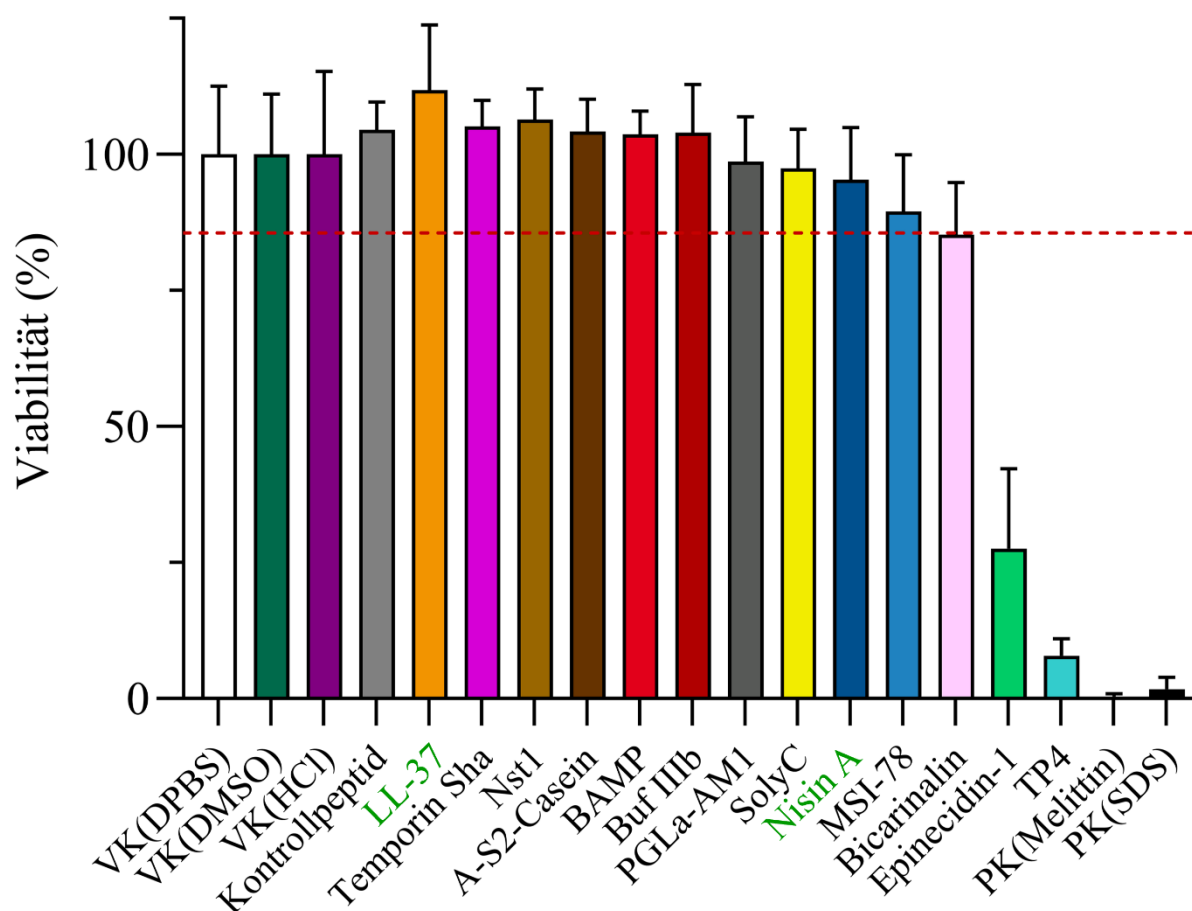


Abbildung 9: Zytotoxizität der AMPs

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 zur 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.

### 3.1.4 Hämolytische Aktivität der AMPs gegenüber humanen Erythrozyten

Weiterhin sollte untersucht werden, 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 (2.2.2.5), äquimolar mit 10  $\mu$ M des jeweiligen AMPs inkubiert und die hämolytische Aktivität experimentell bestimmt (2.2.2.6). Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 zusammengefasst. Ebenso wie in Abbildung 9 zeigt sich ein ähnlicher Einfluss der AMPs auf hE. Die meisten AMPs zeigten keinen Effekt auf die Viabilität der hE,

wohingegen die drei AMPs Nst1, Epinecidin-1 und TP4 bei der getesteten Konzentration die Viabilität signifikant reduzierten. Die AMPs LL-37 und Nisin A, welche sich gegen *H. pylori* DSM 21031 bereits als wirksam erwiesen hatten, zeigten bei einer Stoffmengenkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  keine erkennbare hämolytische Aktivität gegenüber den hE. Ebenso zeigten die Lösungsmittel der Peptide DMSO, HCl und DPBS keinen Effekt auf die Membranintegrität, wohingegen die mitgeführte Peptid-basierte Positivkontrolle Melittin eine starke hämolytische Aktivität relativ zur Positivkontrolle mit dem Detergens Triton X-100 zeigte.

Zusammenfassend zeigten die gegen *H. pylori* wirksamen Peptide LL-37 und Nisin A keine zytotoxische und hämolytische Aktivität bei der getesteten Konzentration. Diese Ergebnisse sind erste Hinweise auf eine mögliche Eignung für die Anwendung beim Menschen.

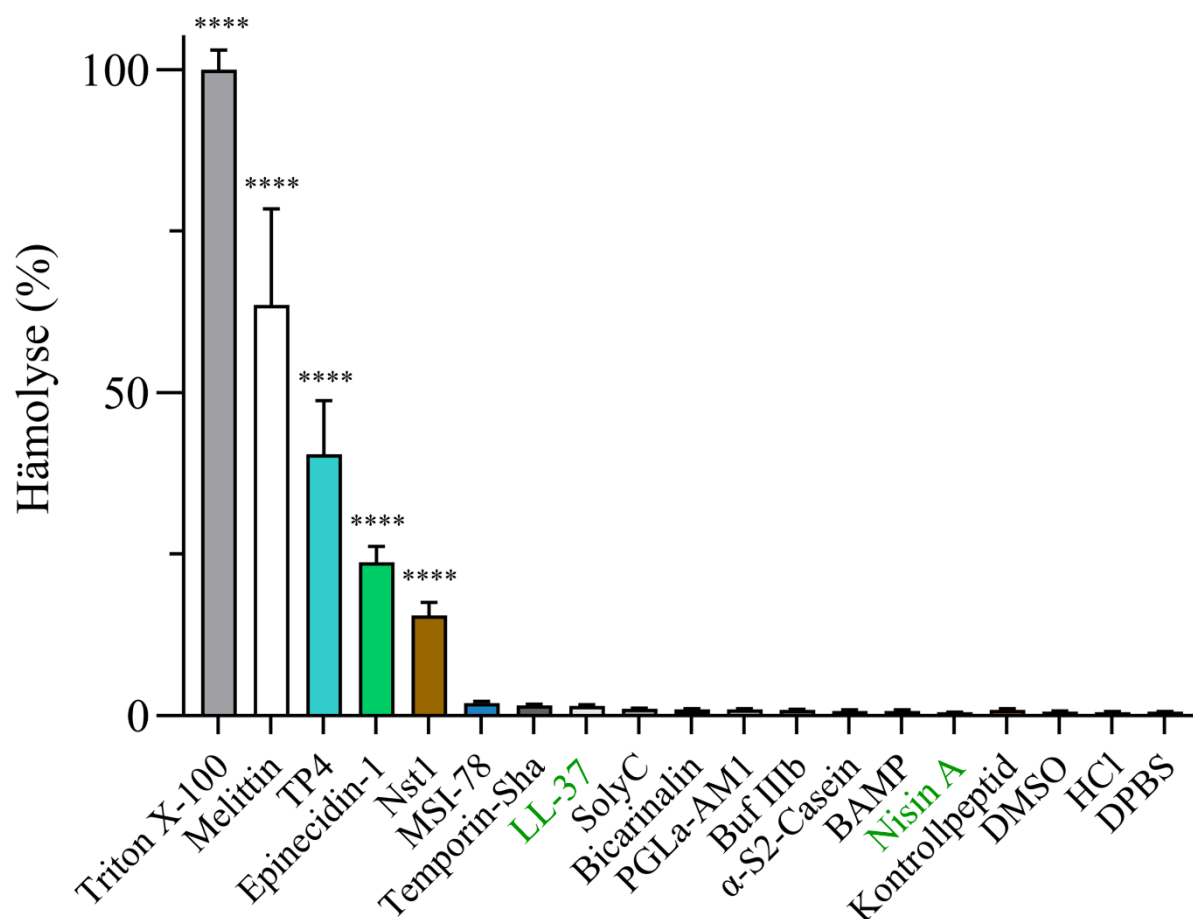


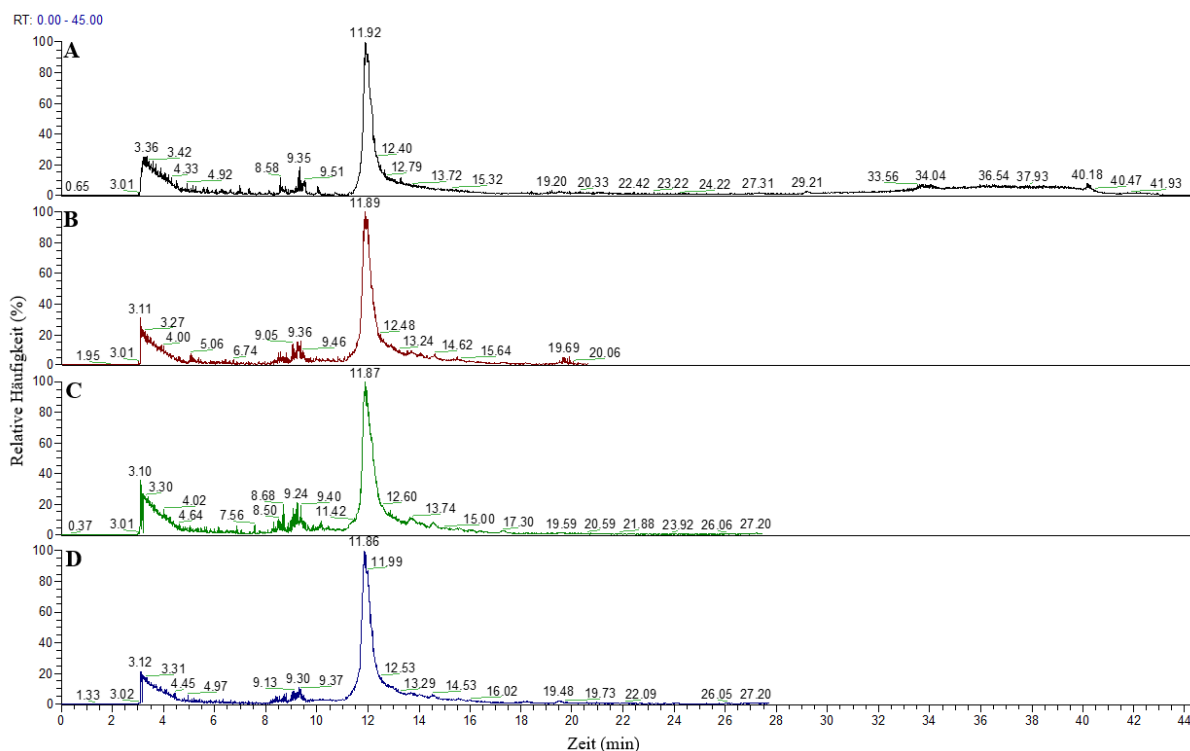
Abbildung 10: Hämolytische Aktivität der AMPs

Die hämolytische Aktivität der AMPs gegenüber humanen Erythrozyten wurde mit einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  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 AMPs LL-37 und Nisin A (grün) zeigten bereits eine starke antimikrobielle Wirkung gegenüber *H. pylori*. 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 statistische Signifikanz wurde mittels one-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur bestimmt. Signifikante Unterschiede der AMPs zur entsprechenden Negativkontrolle sind gekennzeichnet als \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$  und \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ .

### 3.1.5 Pepsin Hydrolyse der AMPs

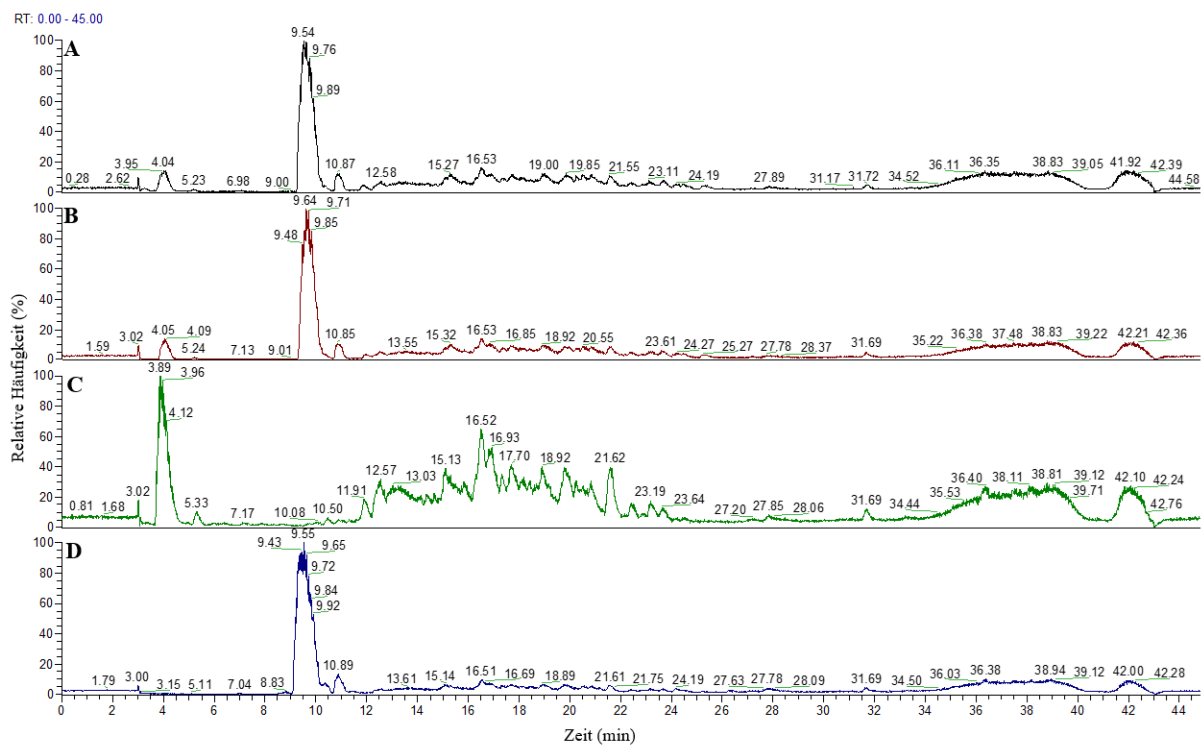
Neben der Toxizität der AMPs für humane Anwendungen wurde weiterhin untersucht, ob die AMPs durch das im menschlichen Magen vorliegende Enzym Pepsin hydrolysiert werden. Eine enzymatische Hydrolyse der Peptide würde dazu führen, dass die AMPs fragmentiert werden und somit bei einer Anwendung im Magenbereich ihre antimikrobielle Wirkung nicht oder nur kurzzeitig entfalten könnten. Hierzu wurden alle Peptidsequenzen (Tabelle 2) mittels ExPASy PeptideCutter (Tabelle 26) *in silico* einer Pepsin-Hydrolyse unterzogen. Hierbei stellte sich heraus, dass alle AMPs außer das Peptid Buf IIIb mehrfach hydrolysiert wurden (Daten nicht gezeigt). Um zu beurteilen, ob die AMPs nach einer Inkubationszeit von 1 h bzw. 24 h durch Pepsin *in vitro* hydrolysiert werden, wurden die AMPs unter Magen-ähnlichen Bedingungen inkubiert. Die Proben wurden im Anschluss mittels LC-MS durch Alexander Croon (Fraunhofer IME) analysiert (2.2.4.7). Das AMP Buf IIIb zeigte keine Sensitivität gegenüber Pepsin nach 24 h (Abbildung 11). Weiterhin zeigte das Peptid BAMP nach 1 h keine Fragmentierung, wohingegen nach 24 h das Peptid vollständig hydrolysiert vorlag (Abbildung 12). Weiterhin zeigte sich, dass die AMPs LL-37 und Nisin A, welche sich gegenüber *H. pylori* bereits als besonders wirksam erwiesen hatten, durch Pepsin bereits innerhalb 1 h hydrolysiert wurden (Abbildung 13, Abbildung 14). Alle weiteren in dieser Arbeit verwendeten AMPs wurden mehrfach durch Pepsin hydrolysiert (Daten nicht gezeigt).

Die Peptide LL-37 und Nisin A, welche antimikrobieller Wirkung gegenüber *H. pylori* besitzen, wurden *in vitro* durch Pepsin hydrolysiert. Daher ist es wahrscheinlich, dass die beiden Peptidkandidaten im Rahmen einer Anwendung im menschlichen Magen ebenfalls durch Pepsin ihre antimikrobielle Wirkung verlieren werden.



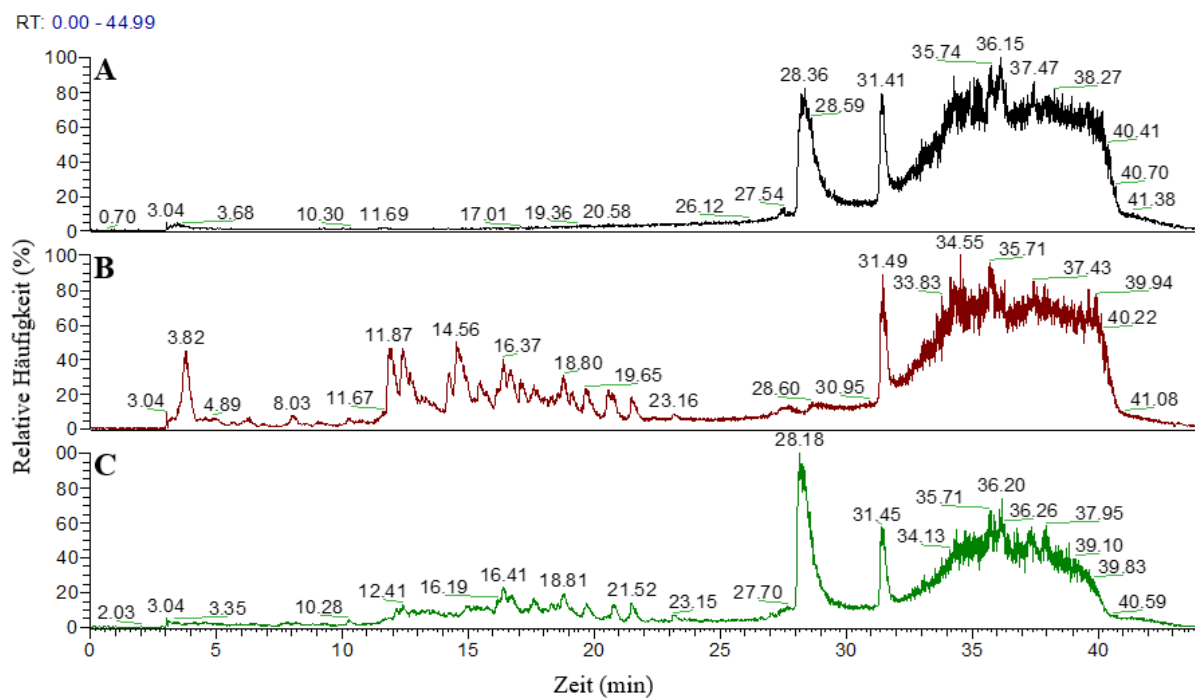
**Abbildung 11: Untersuchung des Peptids Buf IIIb auf enzymatische Hydrolyse durch Pepsin**

Die Sensitivität des Peptids Buf IIIb gegenüber Pepsin wurde untersucht. Hierfür wurde das Peptid ohne Pepsin als Kontrollstandard mitgeführt (A). Weiterhin wurde die Hydrolyse des Peptids mit Pepsin nach 1 h (B) und 24 h (C) sowie mit inaktiviertem Pepsin nach 24 h (D) analysiert. Die Inkubation der Ansätze erfolgte im Verhältnis Pepsin zu Peptid mit 10 U:1 µg bei 37°C im 1x Reaktionslösung (10 mM HCl, 1 % (w/v) NaCl, pH 1,7). Die Peptidfragmentierung wurde anschließend mittels LC-MS analysiert (Alexander Croon, Fraunhofer IME).



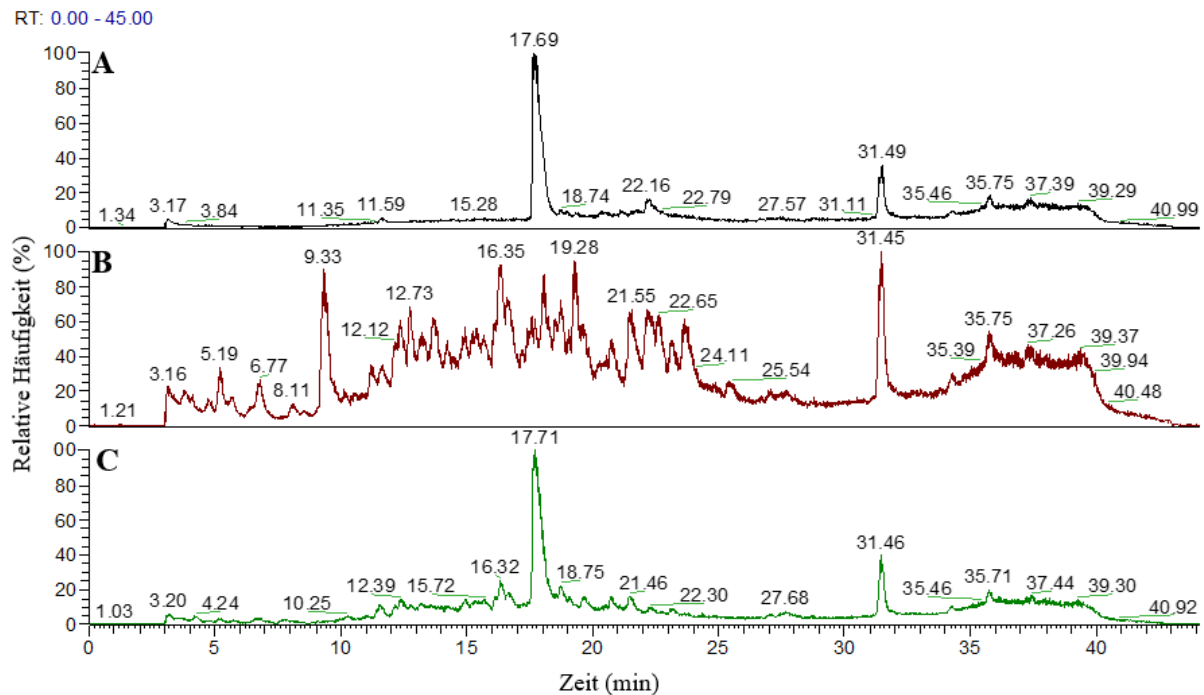
**Abbildung 12: Untersuchung des Peptids BAMP auf enzymatische Hydrolyse durch Pepsin**

Die Sensitivität des Peptids BAMP gegenüber Pepsin wurde untersucht. Hierfür wurde das Peptid ohne Pepsin als Kontrollstandard mitgeführt (**A**). Weiterhin wurde die Hydrolyse des Peptids mit Pepsin nach 1 h (**B**) und 24 h (**C**) sowie mit inaktiviertem Pepsin nach 24 h (**D**) analysiert. Die Inkubation der Ansätze erfolgte im Verhältnis Pepsin zu Peptid mit 10 U:1 µg bei 37°C in 1x Reaktionslösung (10 mM HCl, 1 % (w/v) NaCl, pH 1,7). Die Peptidfragmentierung wurde anschließend mittels LC-MS/MS analysiert (Alexander Croon, Fraunhofer IME).



**Abbildung 13: Untersuchung des Peptids LL-37 auf enzymatische Hydrolyse durch Pepsin**

Die Sensitivität des Peptids LL-37 gegenüber Pepsin wurde untersucht. Hierfür wurde das Peptid ohne Pepsin als Kontrollstandard mitgeführt (A). Weiterhin wurde die Hydrolyse des Peptids mit aktivem (B) und inaktiviertem Pepsin (C) nach 1 h analysiert. Die Inkubation der Ansätze erfolgte im Verhältnis Pepsin zu Peptid mit 10 U:1 µg bei 37°C in 1x Reaktionslösung (10 mM HCl, 1 % (w/v) NaCl, pH 1,7). Die Peptidfragmentierung wurde anschließend mittels LC-MS analysiert (Alexander Croon, Fraunhofer IME).



**Abbildung 14: Untersuchung des Peptids Nisin A auf enzymatische Hydrolyse durch Pepsin**

Die Sensitivität des Peptids Nisin A gegenüber Pepsin wurde untersucht. Hierfür wurde das Peptid ohne Pepsin als Kontrollstandard mitgeführt (A). Weiterhin wurde die Hydrolyse des Peptids mit aktivem (B) und inaktivem Pepsin (C) nach 1 h analysiert. Die Inkubation der Ansätze erfolgte im Verhältnis Pepsin zu Peptid mit 10 U:1 µg bei 37°C in 1x Reaktionslösung (10 mM HCl, 1 % (w/v) NaCl, pH 1,7). Die Peptidfragmentierung wurde anschließend mittels LC-MS analysiert (Alexander Croon, Fraunhofer IME).

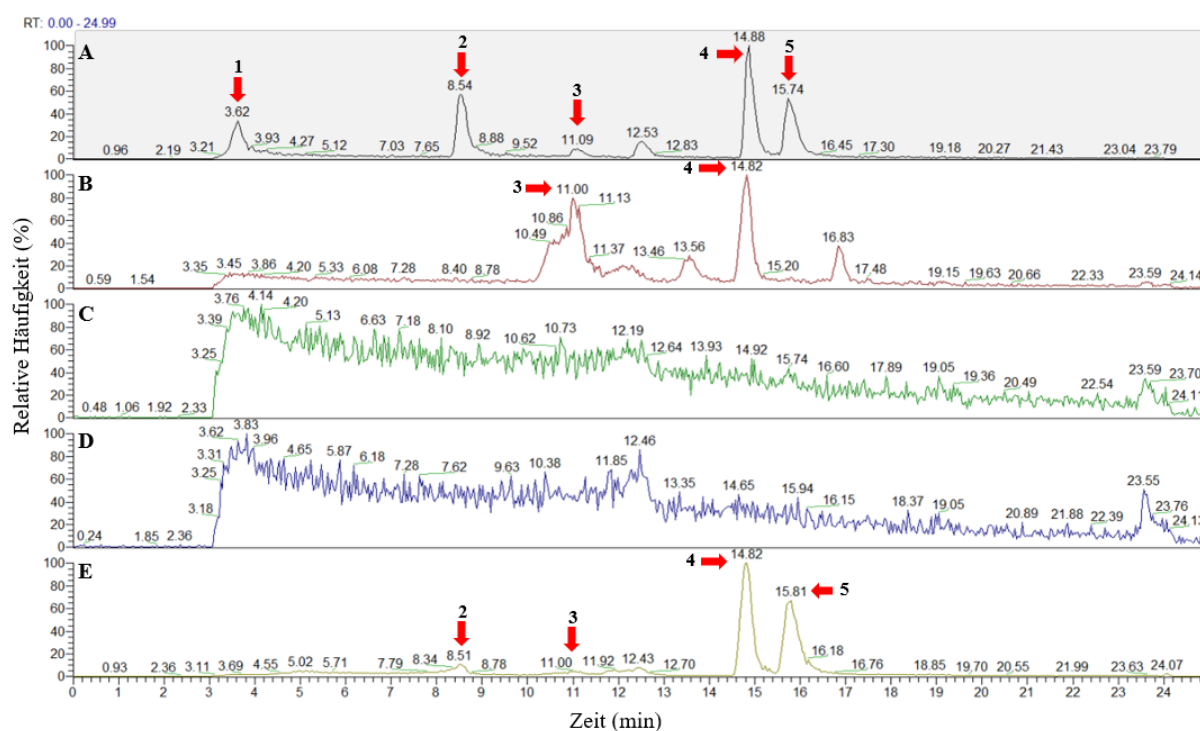
### 3.2 Screening nach gebildeten AI-Typen durch *H. pylori*

Die Expression von AMPs im Trojaner sollte final unter der Kontrolle eines AI-regulierbaren Promotors stehen. Da bereits bekannt war, dass *H. pylori* AI-2 bildet [78], die Synthese von AI-1 und AI-3 durch *H. pylori* in der Literatur jedoch noch nicht beschrieben wurde, sollte durch eigene Untersuchungen mittels LC-MS/MS mit entsprechenden Standards geprüft werden, ob auch AI-1 und/oder AI-3 durch *H. pylori* gebildet werden. Entsprechende Untersuchungen sind nach aktuellem Stand der Literatur nicht beschrieben und würde in dem Fall, dass weitere AI-Typen bei *H. pylori* nachgewiesen werden könnten, die Nutzung alternativer AI-regulierbarer Promotoren ermöglichen [123].

#### 3.2.1 Untersuchung auf Bildung von AI-1

Für den Nachweis von AI-1 wurden fünf unterschiedliche AI-1-Standards als Kontrolle mit 10 µg · mL<sup>-1</sup> jeweils in MilliQ und in das verwendete *H. pylori*-Kulturmedium HP-Medium 2 formuliert (Tabelle 22). Als Positivkontrolle wurde der sterilfiltrierte Kulturüberstand von *Y. enterocolitica* DSM 11503 mitgeführt, da dieser Stamm die AI-1-Moleküle *N*-Hexanoyl-L-

Homoserinlacton und 3-oxo-Octanoylhomoserinlacton natürlich bildet [119]. Als Probe wurde der sterilfiltrierte Kulturüberstand von *H. pylori* DSM 21031 nach 24 h Kultivierungszeit eingesetzt (2.2.4). Die finale OD<sub>600</sub> der *H. pylori*-Kultur betrug ~2,7 und die der *Y. enterocolitica*-Kultur ~7,5. Als Negativkontrolle wurde HP-Medium 2 verwendet. Die Proben wurden einer AI-1 Extraktion unterzogen (2.2.4.1) und mittels LC-MS/MS durch Alexander Croon (Fraunhofer IME) aufgetrennt und analysiert (2.2.4.4). Anhand der jeweiligen Retentionszeiten der Standards (Abbildung 15) und der *m/z* der Vorläuferionen (Tabelle 22) konnten die verschiedenen AI-1 Moleküle zugeordnet werden. Sowohl die fünf AI-1-Standards in MilliQ als auch die durch *Y. enterocolitica* DSM 11503 gebildeten AI-1-Moleküle konnten zuverlässig detektiert werden. Jedoch konnte einer der fünf Standards, *N*-(3-Hydroxybutanoyl)-L-Homoserinlacton, in HP-2 Medium nicht nachgewiesen werden. Weiterhin wurde im Kulturüberstand von *H. pylori* DSM 21031 kein Peak mit dem entsprechenden *m/z* identifiziert, welcher den mitgeführten AI-1 Standards entspricht (Abbildung 15).



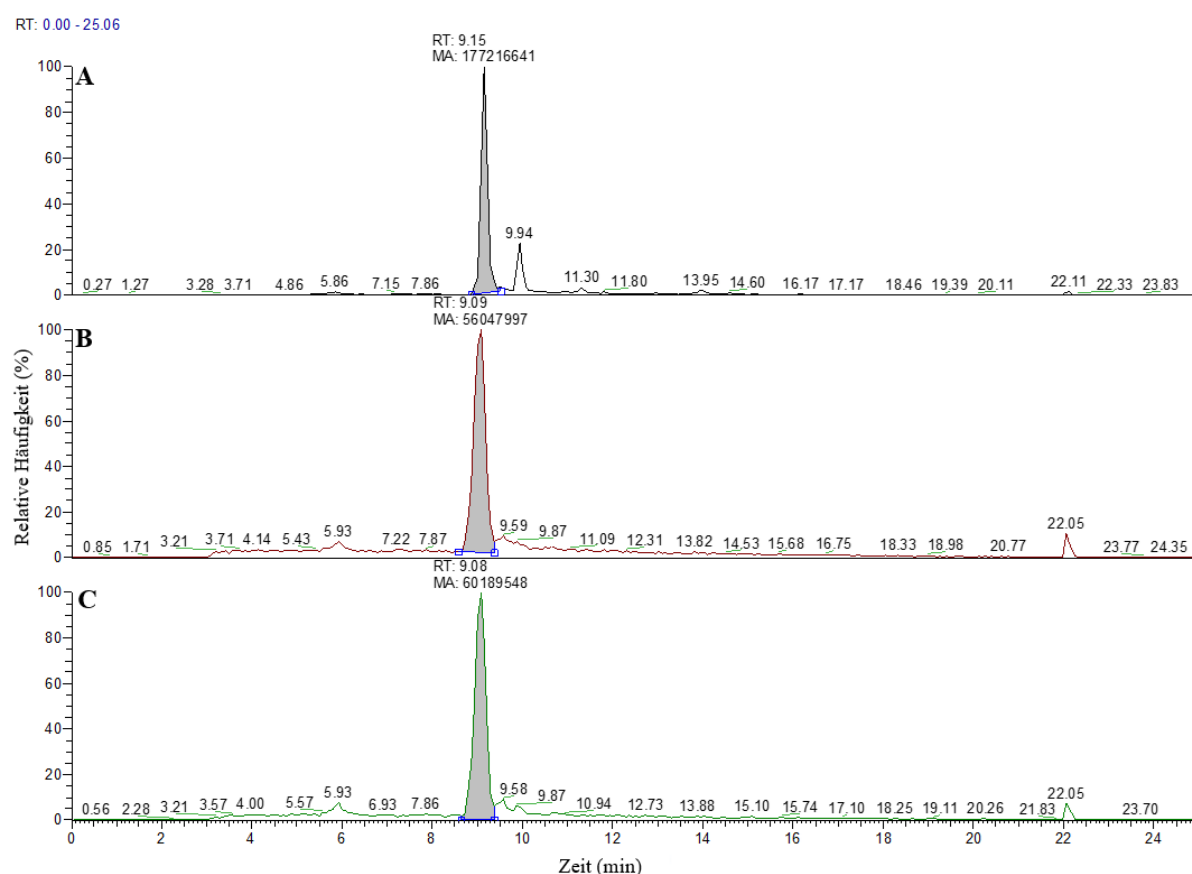
**Abbildung 15: LC-MS/MS Chromatogramme für den Nachweis von AI-1 in *H. pylori*-Kulturüberstand**

Für den Nachweis von AI-1 wurden die fünf verschiedenen AI-1 *N*-(3-Hydroxybutanoyl)-L-Homoserinlacton (1), *N*-Butyryl-L-Homoserinlacton (2), *N*-( $\beta$ -Ketocaproyl)-L-Homoserinlacton (3), *N*-Hexanoyl-L-Homoserinlacton (4), 3-oxo-Octanoylhomoserinlacton (5) in MilliQ (A) sowie in *H. pylori*-Kulturmedium formuliert (E) und mittels LC-MS/MS durch Alexander Croon (Fraunhofer IME) analysiert. Weiterhin wurde für die Analytik der Kulturüberstand von *Y. enterocolitica* DSM 11503 nach 24 h als Positivkontrolle mitgeführt (B). Darüber hinaus wurde der Kulturüberstand einer *H. pylori*-Kultur nach 24 h auf Vorhandensein von AI-1 untersucht (C) sowie das verwendete *H. pylori*-Kulturmedium als Negativkontrolle (D). RT = Retentionszeit.

### 3.2.2 Untersuchung der Bildung von AI-3

Der sterile Kulturüberstand des verwendeten *H. pylori*-Stamms sowie HP-Kulturmedium (Negativkontrolle) und die sieben AI-3 Standards in HP-Kulturmedium (Positivkontrolle) wurden für eine Flüssig-Flüssig-Extraktion eingesetzt (2.2.4.3) und die Extrakte mittels LC-MS/MS durch Alexander Croon (Fraunhofer IME) gemessen (2.2.4.6). Anhand des  $m/z$  der sieben AI-3-Moleküle (Tabelle 22) wurden zwar Signale im Kulturüberstand von *H. pylori* DSM 21031 detektiert, allerdings unterschieden sich die Peakfläche bei keinem der acht AI-3-Moleküle von denen der Negativkontrolle. Der Nachweis des AI-3-Moleküls 3-Isobutyl-5-methyl-2(1H)-pyrazinon ist in Abbildung 16 beispielhaft für eine AI-3-Analytik gezeigt. Die Chromatogramme aller weiteren AI-3-Moleküle sind im Anhang dargestellt (7.1).

Zusammenfassend konnte eine Bildung von AI-1 und AI-3 durch *H. pylori* nicht nachgewiesen werden. Im Hinblick auf die Trojaner-Strategie eignet sich daher nur AI-2 als Induktor für die AI-regulierbare Expressionskassette.



**Abbildung 16: Chromatogramm zur Identifizierung eines AI-3-Moleküls in *H. pylori*-Kulturüberstand**

Für den Nachweis des AI-3-Moleküls bzw. Pyrazinon 4 (3-Isobutyl-5-methyl-2(1H)-pyrazinon) wurde das Molekül in *H. pylori*-Kulturmedium als Positivkontrolle formuliert (A). Der sterile Kulturüberstand von *H. pylori* DSM 21031 nach 24 h wurde als Probe (B) und das *H. pylori*-Kulturmedium wurde als Negativkontrolle mitgeführt (C). Die Proben wurden anschließend mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion extrahiert und die Extrakte mittels LC-MS/MS durch Alexander Croon (Fraunhofer IME) gemessen.

### 3.3 Generierung eines trojanischen *H. pylori*

Um den Wirkstoff gezielt zum Ort der Infektion zu bringen, sollte ein trojanischer *H. pylori* entwickelt werden. Als Ausgangspunkt diente der gut charakterisierte Stamm *H. pylori* DSM 21031. Dieser sollte dann durch die Deletion einzelner Pathogenitätsfaktoren schrittweise attenuiert werden, um bei Infektionsversuchen eine reduzierte Immunantwort zu erzielen. Weiterhin muss dieser Stamm in der Lage sein, trotz des Verlusts entsprechender Pathogenitätsfaktoren, den Magen zu kolonisieren. Da hoch virulente *H. pylori*-Stämme über die *cagPAI* verfügen sowie *cagA*<sup>+</sup> und *vacA*<sup>+</sup> sind [37], war es Ziel dieser Arbeit dieses Gencluster bzw. diese Gene zu deletieren. Darüber hinaus steht der *iceAI*-Locus in Assoziation mit der Ausbildung von Magengeschwüren [67, 68]. Der verwendete *H. pylori*-Stamm verfügt über das *iceA2*-Allel, dessen Funktion nach aktuellem Stand der Literatur unbekannt ist. Daher wurde vermutet, dass die Bildung von IceA2 eine ähnliche Auswirkung auf die Pathogenese haben könnte wie IceA1. Obwohl der Zusammenhang der jeweiligen Allele mit dem klinischen Verlauf umstritten ist [69-71], sollte das IceA2-Allel aus dem Genom des Ausgangsstamms deletiert werden. Da im trojanischen *H. pylori* später die Expression wirksamer AMPs durch den bakteriellen Autoinducer AI-2 erfolgen soll, muss zudem sichergestellt werden, dass der Trojaner selbst nicht mehr in der Lage ist diesen zu bilden. Entsprechend sollte der *luxS*-Locus deletiert werden, um die enzymatische AI-2-Synthese zu unterbinden und somit eine Selbstinduktion einer AI-2-regulierbaren Reporter-kassette perspektivisch zu verhindern. Final sollte eine solche Expressionskassette in das Genom integriert werden, wobei ein optisch nachweisbarer Reporter perspektivisch als Platzhalter für die Integration einer AMP DNA-Sequenz dienen soll.

#### 3.3.1 Klonierung von Deletionsplasmiden

Um eigene Deletionsplasmide zu erzeugen, wurde für die Stammentwicklung das Plasmid-System pUreA-difH-RC (Tabelle 3) als Ausgangsplasmid verwendet. Hierfür wurde für unterschiedliche Klonierungsansätze das Plasmid-Rückgrat mittels PCR so amplifiziert (2.2.3.4), dass die bereits auf dem Plasmid vorhandenen homologen *ureA*-Flanken und die dazwischenliegenden DNA-Sequenzen nicht mit amplifiziert wurden. Für eine gezielte Deletion eines Locus wurden ausgehend von genomischer DNA von *H. pylori* DSM 21031 DNA-Sequenzen mit einer Größe von 1 kbp amplifiziert, welche den Ziellocus flankieren und zu diesem homolog sind (2.2.3.4). Weiterhin wurde die *rpsL-cat*-Selektionskassette aus dem Plasmid pUreA-difH-RC amplifiziert (2.2.3.4). Alle PCR-Produkte wurden aufgereinigt (2.2.3.1) und die DNA-Isolate mittels Agarose-Gelelektrophorese hinsichtlich der DNA-

Bandengröße analysiert (2.2.3.7). Anschließend wurden die entsprechenden PCR-Produkte für eine Klonierung verwendet (2.2.3.8), um entsprechende Deletionsplasmide zu erzeugen. Eine Übersicht zur Amplifikation der PCR-Produkte mit den jeweiligen Primerpaaren sowie zu den entsprechenden Klonierungsansätzen für die Deletionsplasmide sind in Tabelle 17 dargestellt. Anschließend wurden *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen mit den Klonierungsansätzen transformiert (2.2.3.10), die enthaltene Plasmid-DNA aus den Flüssigkulturen aufgereinigt (2.2.3.1), restringiert (2.2.3.6) und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (2.2.3.7) (Daten nicht gezeigt). Final wurden die Plasmide mit den Primerpaaren P52/53 und P69/70 (Tabelle 19) sequenziert (2.2.3.9) (Daten nicht gezeigt) und entsprechende positive Klone bei -80°C eingefroren (Tabelle 1, 2.2.1.1).

Insgesamt konnten somit erfolgreich die vier Deletionsplasmide pTZ12 ( $\Delta luxS$ ), pTZ13( $\Delta vacA$ ), pTZ14 ( $\Delta iceA2$ ) und pTZ17 ( $\Delta cagA$ ) erzeugt werden (Tabelle 17). Diese wurden nachfolgend für die Erzeugung von Deletionen in *H. pylori* verwendet.

**Tabelle 17: Übersicht über die Klonierungsansätze zur Generierung der Deletionsplasmide**

Template	Primerpaar	PCR-Produkte im Klonierungsansatz	Erzeugtes Plasmid
gDNA	P56/57	<i>luxS</i> linke homologe Flanke	pTZ12
gDNA	P60/61	<i>luxS</i> rechte homologe Flanke	
pUreA-difH-RC	P54/55	Plasmid-Rückgrat	
pUreA-difH-RC	P58/59	<i>difH-rpsL-cat</i>	
gDNA	P74/75	<i>vacA</i> linke homologe Flanke	pTZ13
gDNA	P76/77	<i>vacA</i> rechte homologe Flanke	
pUreA-difH-RC	P72/73	<i>difH-rpsL-cat</i>	
pUreA-difH-RC	P78/79	Plasmid-Rückgrat	
gDNA	P110/111	<i>iceA2</i> linke homologe Flanke	pTZ14
gDNA	P112/113	<i>iceA2</i> rechte homologe Flanke	
pUreA-difH-RC	P72/73	<i>difH-rpsL-cat</i>	
pUreA-difH-RC	P78/79	Plasmid-Rückgrat	
gDNA	P80/81	<i>cagA</i> linke homologe Flanke	pTZ17
gDNA	P82/83	<i>cagA</i> rechte homologe Flanke	
pUreA-difH-RC	P72/73	<i>difH-rpsL-cat</i>	
pUreA-difH-RC	P78/79	Plasmid-Rückgrat	

gDNA = genomische DNA von *H. pylori* DSM 21031; P = Primer; TZ = Tobias Zumbusch.

### 3.3.2 Erzeugung von Modifikationen und Deletionen in *H. pylori*

Um die *Selection/Counter-Selection*-Kassette des Plasmid-Systems pUreA-difH-RC für die Stammentwicklung in *H. pylori* DSM 21031 nutzen zu können, muss der Stamm zu Beginn

über eine Streptomycin-Resistenz verfügen (2.1.5). Hierfür müssen innerhalb des Genoms im *rpsL*-Locus zwei Punktmutationen erzeugt werden, die jeweils in einem Aminosäure-Austausch von Lysin zu Arginin (Lys43Arg und Lys88Arg) resultieren [124]. Daher wurde ausgehend von dem Stamm *H. pylori* DSM 21031 eine genomische PCR mit dem Primerpaar P31/32 (Tabelle 19) durchgeführt (2.2.3.4), um ein mutiertes *rpsL*-Allel mit Lys43Arg (AAA129AGA) und Lys88Arg (AAG263AGG) zu amplifizieren. Das PCR-Produkt wurde nachfolgend über eine Agarose-Gelelektrophorese separiert (Daten nicht gezeigt) (2.2.3.7), mittels Kit aufgereinigt (2.2.3.1) und im Anschluss wurde die DNA-Konzentration quantifiziert (2.2.3.3). Der Stamm *H. pylori* DSM 21031 wurde mit dem aufgereinigten PCR-Produkt über die natürliche Kompetenz transformiert (2.2.3.11), wobei eine anschließende Selektion auf Agarplatten mit Streptomycin für sieben Tage erfolgte. Die genomische Modifikation des erzeugten Stamms wurde im Anschluss mittels PCR-Amplifikation (2.2.3.4), Agarose-Gelelektrophorese (2.2.3.7) und Sequenzierung (2.2.3.9, Tabelle 18) verifiziert (Daten nicht gezeigt). Anhang der Sequenzierungsergebnisse wurde die Erzeugung des Streptomycin-resistenten Stamms *H. pylori* HP1 bestätigt (Tabelle 18). Ein entsprechender Klon wurde nachfolgend bei -80°C gelagert (Tabelle 1, 2.2.3.11). Anhand der Sequenzierungsergebnisse zeigte sich, dass die Modifikation Lys88Arg (AAG263AGG), nicht aber die Modifikation Lys43Arg (AAA129AGA) erzeugt wurde (Daten nicht gezeigt). Da bereits eine der beiden vorgesehenen Punktmutationen in der Ausbildung einer Streptomycin-Resistenz resultierte, wurde die ausstehende Modifikation Lys43Arg nachträglich nicht mehr erzeugt.

Die Deletion der Loci *luxS*, *vacA*, *iceA2* und *cagA* erfolgte sequenziell. Hierfür wurde der Stamm *H. pylori* HP1 mit einem Locus-spezifischen Deletionsplasmid (Tabelle 3) transformiert und über homologe Rekombination wurde die gewünschte Deletion erzeugt (2.2.3.11, Tabelle 18). Der so generierte Folgestamm diente als Ausgangsstamm für die Erzeugung der nächsten Deletion (Tabelle 18). Die Erzeugung des Stamms *H. pylori* HP5 erfolgte durch Dr. Andreas Schiermeyer (Fraunhofer IME). Die Verifizierung einer genomischen Modifikation eines einzelnen Klons erfolgte wie bereits oben beschrieben mittels Sequenzierung und entsprechenden Primern (Tabelle 18).

Final wurde der Quadrupel-Knockout-Stamm *H. pylori* HP5 ( $\Delta luxS$ ,  $\Delta vacA$ ,  $\Delta iceA2$ ,  $\Delta cagA$ ) erzeugt. Die ersten Pathogenitätsversuche wurden aus Zeitgründen mit dem Stamm *H. pylori* HP4 durchgeführt (3.3.7). Da sich in nachfolgenden Versuchen herausstellte, dass dieser Stamm nicht ausreichend attenuiert war, wurde nachträglich der Stamm *H. pylori* HP5 erzeugt. Dieser wurde noch nicht für Pathogenitätsversuche eingesetzt.

Tabelle 18: Übersicht über die *H. pylori* Stammentwicklung

Ausgangsstamm	Transformation	Erzeugter Stamm	Genotyp	Sequenzierung
<i>H. pylori</i> DSM 21031	<i>rpsL</i> (Lys88Arg) (PCR-Produkt)	<i>H. pylori</i> HP1	<i>rpsL</i> (Lys88Arg)	P33/34
<i>H. pylori</i> HP1	pTZ12	<i>H. pylori</i> HP2	<i>rpsL</i> (Lys88Arg), $\Delta luxS$	P41/42
<i>H. pylori</i> HP2	pTZ13	<i>H. pylori</i> HP3	<i>rpsL</i> (Lys88Arg), $\Delta luxS$ , $\Delta vacA$	P108/109
<i>H. pylori</i> HP3	pTZ14	<i>H. pylori</i> HP4	<i>rpsL</i> (Lys88Arg), $\Delta luxS$ , $\Delta vacA$ , $\Delta iceA2$	P107/114
<i>H. pylori</i> HP4	pTZ17	<i>H. pylori</i> HP5	<i>rpsL</i> (Lys88Arg), $\Delta luxS$ , $\Delta vacA$ , $\Delta iceA2$ , $\Delta cagA$	P125/126

P = Primer; n.a. = nicht anwendbar; Cm<sup>R</sup> = Chloramphenicol-Resistenz.

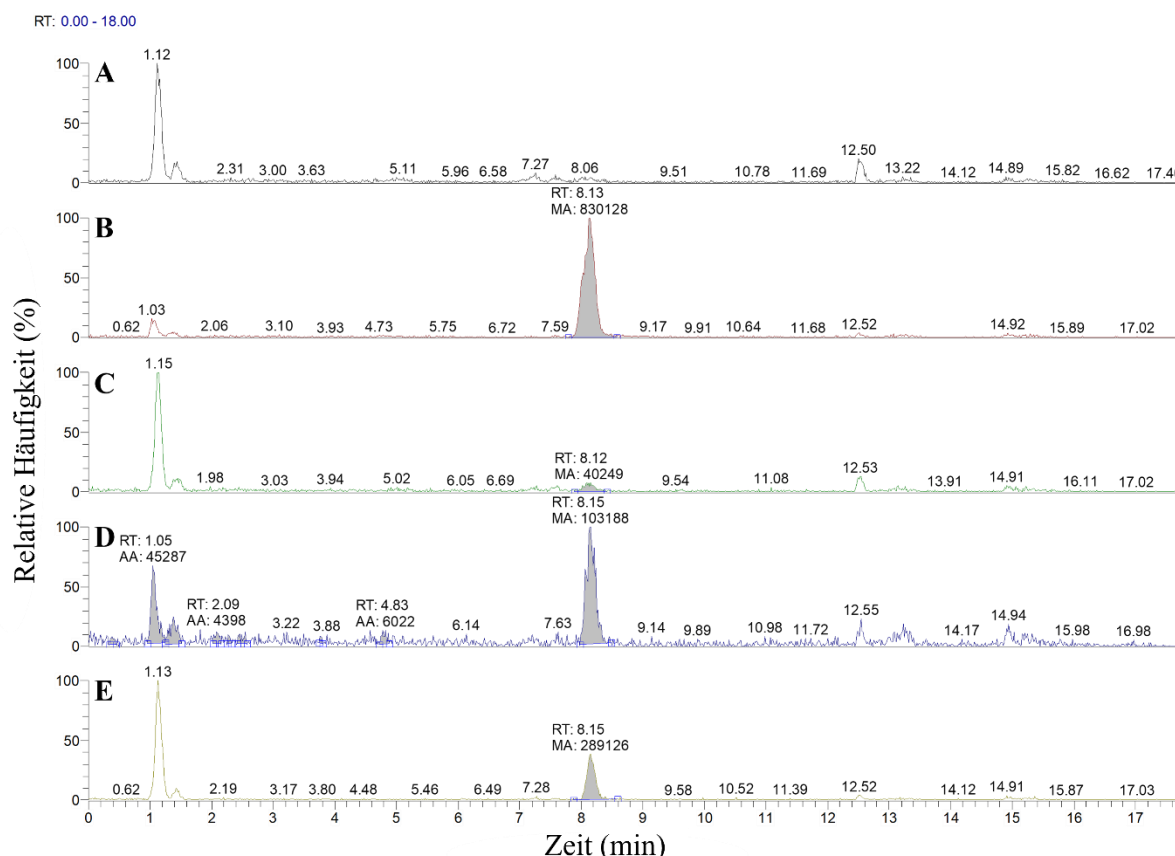
### 3.3.3 Quantifizierung der AI-2-Konzentration

Um eine Selbstinduktion einer AI-regulierbaren Expressionskassette durch AI-2 im Trojaner zu unterbinden, muss die LuxS-katalysierte Synthese von DPD, einer Vorstufe des AI-2, unterbunden werden. Hierfür wurde der *luxS*-Locus mit Hilfe des Plasmids pTZ12 deletiert (3.3.2). Der Erfolg des Knockouts wurde anschließend durch eine Quantifizierung des Moleküls DPD aus dem Kulturüberstand einer Schüttelkolben-Flüssigkultur mittels LC-MS/MS überprüft.

Zu diesem Zweck wurden die Stämme *H. pylori* DSM 21031 und *H. pylori* HP2 auf einer HP-Agarplatte kultiviert (2.2.1.2). Am Folgetag wurden pro Stamm jeweils drei Flüssigkulturen angesetzt (2.2.1.3). Die Kultivierung wurde insgesamt an drei unabhängigen Tagen durchgeführt. Der Mittelwert der OD<sub>600</sub> für *H. pylori* DSM 21031 betrug ~1,7 und für HP2 ~0,7. Das im filtrierte Kulturüberstand enthaltene DPD wurde aus dem Filtrat extrahiert und zu dem Molekül MQED derivatisiert (2.2.4.2). Anschließend erfolgte eine LC-MS/MS-Analyse der Proben (Abbildung 17). Die Quantifizierung der MQED-Konzentration wurde anhand einer Kalibriergeraden durchgeführt (Abbildung 18A). Die LC-MS/MS Analyse und die Quantifizierung erfolgte durch Alexander Croon (Fraunhofer IME) (2.2.4.5). Für die Vergleichbarkeit wurden die gemessenen MQED-Konzentrationen auf den OD<sub>600</sub>-Wert der jeweiligen Kultur normalisiert (Abbildung 18B). Der *luxS*-Deletionsstamm *H. pylori* HP2 zeigte gegenüber dem Wildtyp *H. pylori* DSM 21031 eine signifikante Reduktion der AI-2-Konzentration (two-tailed *t*-test  $p < 0,0001$ ) von 99,97 %. Darüber hinaus zeigt sich jedoch auch, dass trotz Deletion des *luxS*-Locus eine AI-2-Synthese nicht vollständig unterbunden wurde, da eine geringe AI-2-Konzentration weiterhin detektiert wurde (Abbildung 17, Abbildung 18B). Anhand der Positivkontrolle, welche aus *H. pylori* HP2 Kulturüberstand mit

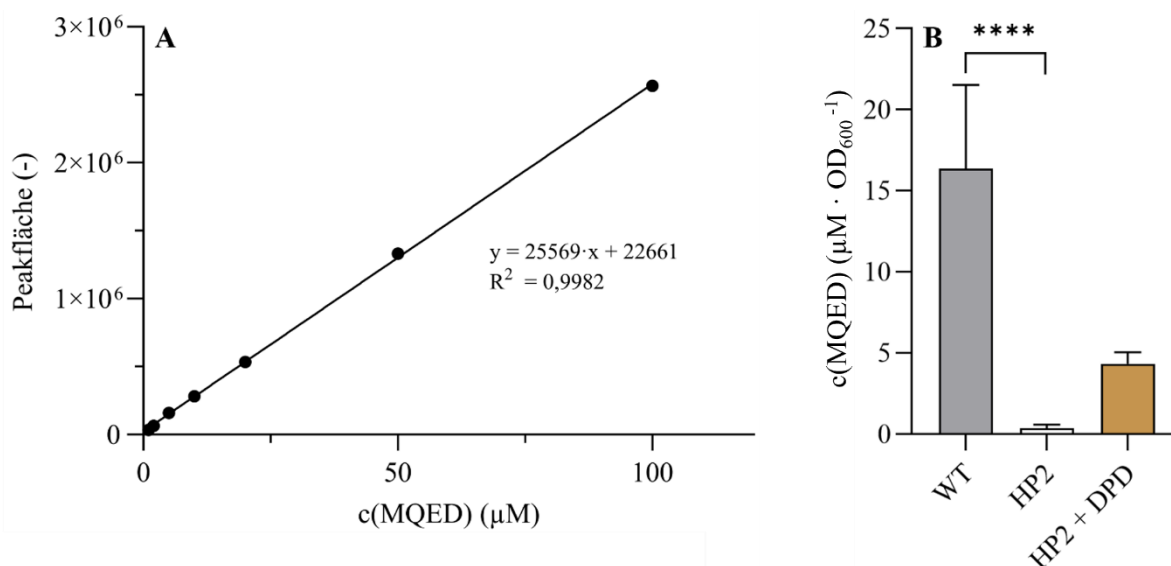
10  $\mu\text{M}$  DPD bestand, zeigt sich, dass 5 von 10  $\mu\text{M}$  des eingesetzten DPD wiedergefunden wurden (Abbildung 18B).

Insgesamt wurde durch den Knockout des *luxS*-Locus eine signifikante Reduktion der AI-2 Synthese nachgewiesen. Daher kann die Integration einer AI-2-regulierbaren Expressionskassette in das Genom des Trojaners realisiert werden.



**Abbildung 17: 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). Weiterhin wurde als Probe der Kulturüberstand des *luxS*-Deletionsstamms *H. pylori* HP2 verwendet (C). 10  $\mu\text{M}$  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 weitere Positivkontrolle 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 18: Indirekte Quantifizierung der AI-2-Konzentration mittels LC-MS/MS**

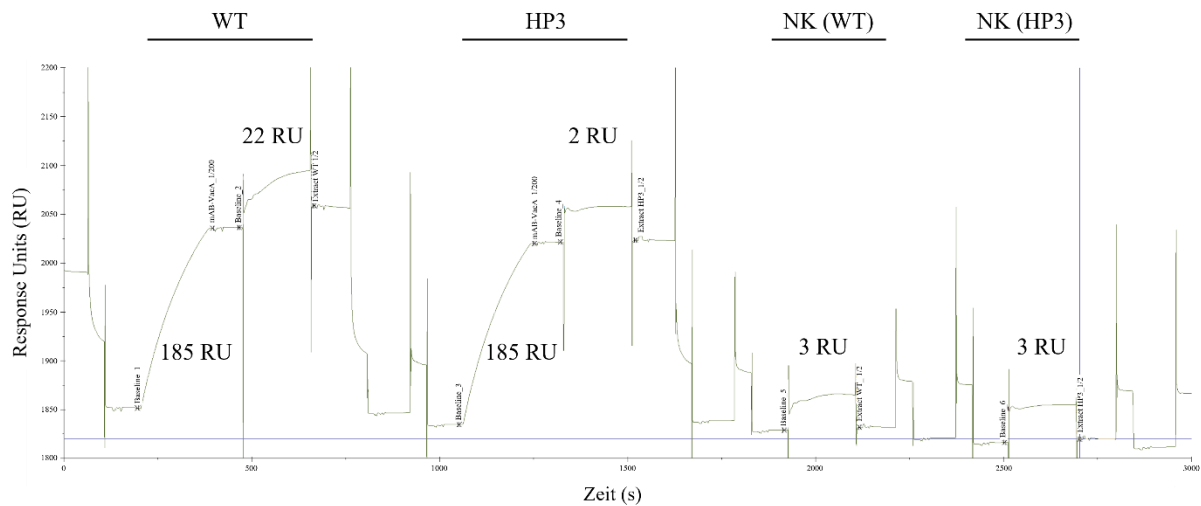
Für die indirekte Quantifizierung von AI-2 wurde eine Kalibriergerade erstellt (A). Hierfür wurde die Vorstufe 4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion (DPD) zu dem stabilen Molekül 1-(3-Methyl-2-chinoxaliny)-1,2-ethandiol (MQED) derivatisiert, anschließend extrahiert und die gelösten Extrakte mittels LC-MS/MS durch Alexander Croon (Fraunhofer IME) 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 weitere Kontrolle 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 durch Alexander Croon (Fraunhofer IME) gemessen (B). Die MQED-Konzentration wurde auf die OD<sub>600</sub> der jeweiligen Kultur normalisiert und ist als Mittelwert ± SD dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels *t*-Test (Mann-Whitney Test) bestimmt. Der signifikante Unterschied zwischen den Proben ist mit \**p* < 0,0322, \*\* *p* < 0,0021, \*\*\**p* < 0,0002 oder \*\*\*\**p* < 0,0001 gekennzeichnet. 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.

### 3.3.4 SPR-basierter Nachweis des VacA-Proteins

VacA ist einer der Hauptpathogenitätsfaktoren von *H. pylori*. Das VacA-Protein kann Lipid-Doppelschichten perforieren [12], kann zelluläre Veränderungen wie die Inaktivierung des Energiemetabolismus der Mitochondrien auslösen [13] und hat eine immunomodulatorische Funktion [61]. Um die Pathogenität des Trojaners zu reduzieren, wurde der *vacA*-Locus mit Hilfe des zuvor genierten Plasmids pTZ13 deletiert (3.3.2), wodurch die Expression von VacA verhindert werden soll. Anhand eines kommerziellen Antikörpers sollte das VacA-Protein spezifisch aus den Kulturüberständen des Wildtyp und Knockout-Stamms HP3 gebunden werden. Um die molekularen Interaktionen zwischen Analyt und Antikörper schnell und effizient zu charakterisieren, sollte eine SPR-Analyse (2.2.3.16) durchgeführt werden.

Für die Bakterienstämme *H. pylori* DSM 21031 und *H. pylori* HP3 ( $\Delta vacA$ ) wurden entsprechende Schüttelkolben-Flüssigkulturen mit einer initialen OD<sub>600</sub> = 0,15 erstellt (2.2.1.3).

Nach einer Inkubation von 24 h wurde eine  $OD_{600} \sim 1,7$  für den Wildtyp und eine  $OD_{600} \sim 0,7$  für den Knockout-Stamm gemessen. Anschließend wurden die Kulturen jeweils auf eine  $OD_{600} = 0,7$  mit Kulturmedium verdünnt und filtriert (2.2.1.3). Eine qualitative Detektion des VacA-Proteins erfolgte direkt aus den filtrierten Kulturüberständen. Der Stamm *H. pylori* DSM 21031 wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Als Negativkontrolle wurden die Wechselwirkungen der zwei Kulturüberstände mit dem Chip ohne gebundenen *Detection Antibody* analysiert. Ein entsprechender kommerzieller VacA-Proteinstandard stand zum Zeitpunkt der Messung nicht zur Verfügung. Versuche, das VacA-Protein rekombinant zu exprimieren, waren nicht erfolgreich. So konnte das VacA-Protein zwar mittels eines zellfreien Proteinexpressionssystems exprimiert, aber nicht in Lösung gebracht werden (Daten nicht gezeigt), weshalb die SPR-Messung ohne VacA-Proteinstandard erfolgte. Daher wurde eine qualitative SPR-Analytik durchgeführt. Die Proben wurden in HPS-EP verdünnt und das Bindungsverhalten mittels SPR-Spektroskopie analysiert (2.2.3.16). Die SPR-Analytik erfolgte durch Holger Spiegel (Fraunhofer IME). Anhand des Sensogramms zeigte sich, dass im Analyten des Stamms *H. pylori* DSM 21031 ein VacA-spezifisches Signal von 22 RU detektiert wurde (Abbildung 19). Weiterhin wurde für den Analyten des Stamms *H. pylori* HP3 ein Signal von 2 RU detektiert, welches unterhalb des Signals der entsprechenden Negativkontrolle mit 3 RU lag (Abbildung 19). Das Signal der Negativkontrolle des Wildtyp-Stamms lag bei ebenfalls 3 RU (Abbildung 19).



**Abbildung 19: SPR-basierter Nachweis des VacA-Proteins in *H. pylori*-Kulturüberständen**

Der Kulturüberstand von *H. pylori* DSM 21031 (WT) und *H. pylori* HP3 ( $\Delta vacA$ ) wurde für eine SPR-Spektroskopie-Analyse eingesetzt. Für den Nachweis wurde ein VacA-Antikörper an einen RAM-FC funktionalisierten CM5 Chip gebunden (185 RU). Dieser wurde dazu verwendet, um die Bindungsereignisse der im Kulturüberstand enthaltenen VacA-Proteine des Wildtyps (22 RU) und des Knockout-Stamms HP3 (2 RU) zu untersuchen. Für beide Stämme wurde eine Kreuzreaktivitätskontrolle (NK) mitgeführt, um die Wechselwirkungen der Probenbestandteile mit der RAM-FC funktionalisierten CM5 Chip zu beurteilen. Hierfür wurde die Probe in Abwesenheit des VacA-Antikörpers auf den Chip aufgetragen. RU = *Response Unit*; NK = Negativkontrolle.

### 3.3.5 Untersuchung des *iceA2* Knockout-Stamms mittels Sequenzierung

Der verwendete Stamm *H. pylori* DSM 21031 trägt das *iceA*-Allel *iceA2*, nicht jedoch das Allel *iceA1*, über das bekannt ist, dass es in Assoziation mit der Ausbildung von Magengeschwüren steht [67, 68]. Obwohl die Funktion des IceA2-Proteins bisher noch nicht bekannt ist [72], wurde angenommen, dass IceA2 ebenfalls eine ähnliche Rolle in der Pathogenese spielen könnte wie IceA1. Daher wurde der *iceA2*-Locus mit Hilfe des Plasmids pTZ14 deletiert (3.3.2). Ein quantitativer Nachweis des IceA2-Proteins war nicht möglich, da keine entsprechenden Antikörper für die Detektion zum Beispiel über einen 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 der *iceA2*-Deletion im Stamm *H. pylori* HP4 nur im Rahmen einer Sequenzierung, welche bestätigte, dass die codierende Sequenz aus dem Genom deletiert wurde (Abbildung 20).

Die Synthese des Hauptpathogenitätsfaktors VacA wurde im Trojaner nicht nachgewiesen. Der Knockout des *iceA2*-Locus wurde mittels Sequenzierung bestätigt. Ausgehend von dem Trojaner HP4 sollten nachfolgend erste Infektionsversuche durchgeführt werden, um den Einfluss der Knockouts auf die Kolonisierungseffizienz des Trojaners zu bewerten sowie Ergebnisse zu der verbleibenden Pathogenität des Stamms zu erhalten.

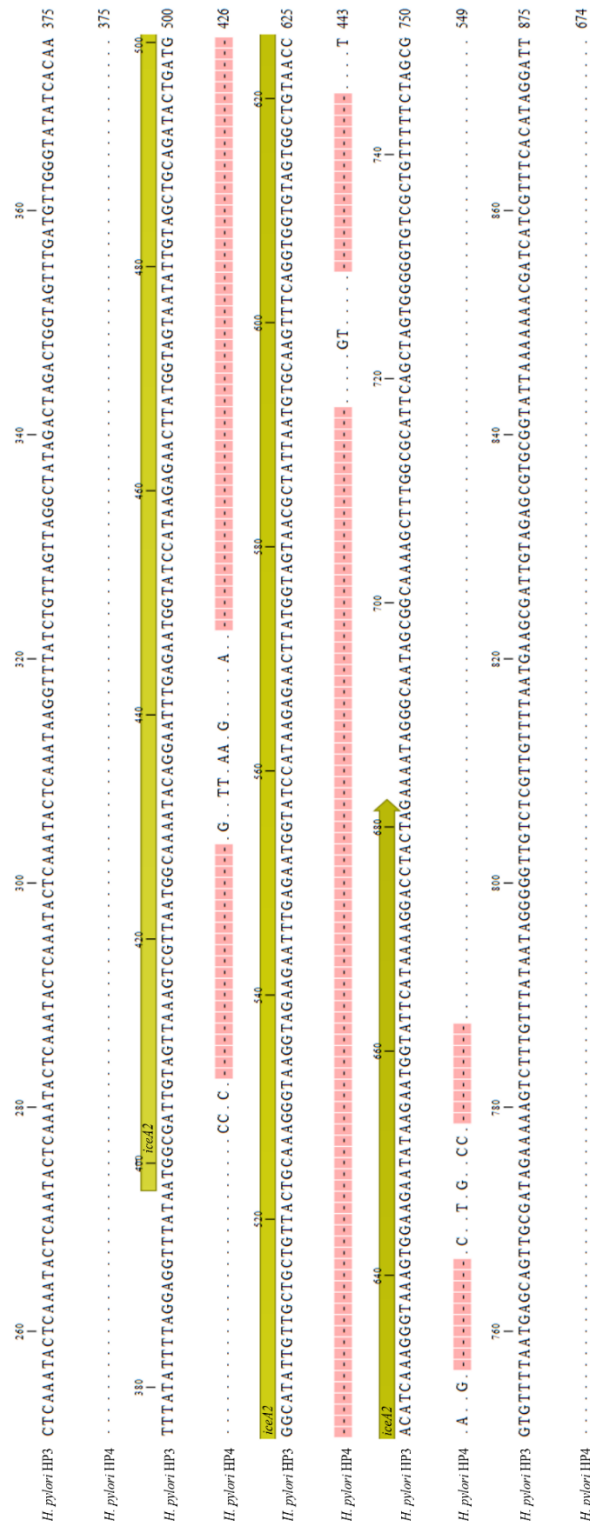
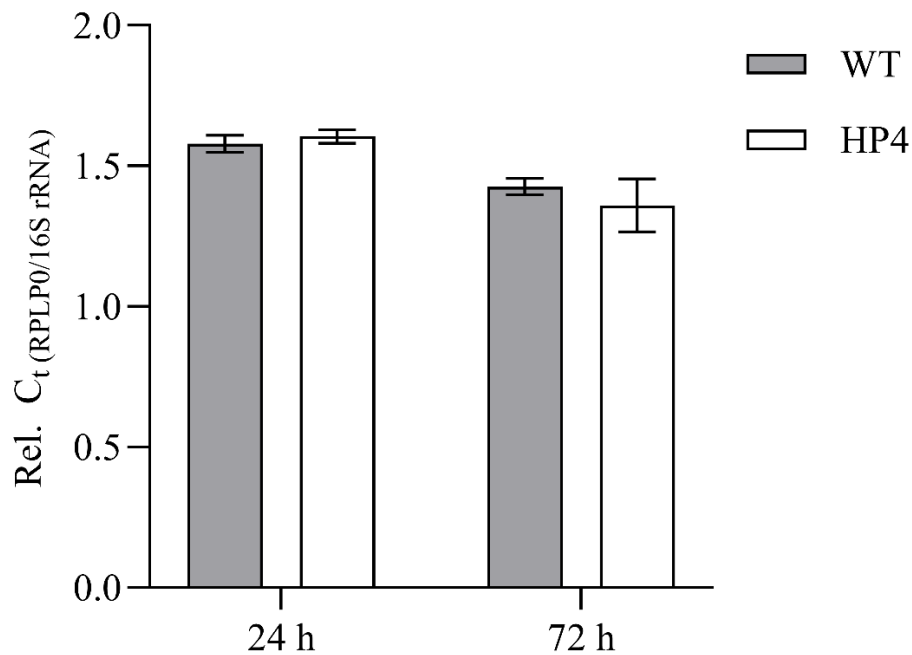


Abbildung 20: DNA-Sequenz Alignment zum Nachweis der *iceA2*-Deletion

Der *iceA2*-Locus (ca. 290 bp, gelb dargestellt) wurde aus dem Stamm *H. pylori* HP3 deletiert und der Stamm *H. pylori* HP4 ( $\Delta iceA2$ ) wurde erzeugt. Die Genome beider Stämme wurden für ein Alignment in der Software CLC Genomics Workbench eingesetzt, um die Deletion des *iceA2*-Locus darzustellen. Homologe DNA-Sequenzen des Stamms *H. pylori* HP4 zum Ausgangsstamm wurden durch Punkte und fehlende DNA-Sequenzabschnitte durch Bindestriche in einer roten Box dargestellt. Teils homologe DNA-Sequenzabschnitte innerhalb des deletierten *iceA2*-Locus im Genom des Stamms *H. pylori* HP4 entstammen aus dem verwendeten Deletionsplasmid. Diese Sequenzabschnitte verbleiben nach einer erfolgreichen Deletion im entsprechenden Locus.

### 3.3.6 Kolonisierungseffizienz des Trojaners HP4

Zur Untersuchung der Kolonisierungseffizienz des Trojaners HP4 wurden *in vitro* Infektionsversuche durchgeführt. Hierzu wurden von zwei unterschiedlichen Spendern humane Magenschleimhautzellen passagiert (2.2.2.3) und anschließend jeweils mit dem Stamm *H. pylori* HP4 und *H. pylori* DSM 21031 als Wildtypkontrolle infiziert (2.2.2.4). Weiterhin wurde DPBS als Vehikelkontrolle eingesetzt, um die Abwesenheit von *H. pylori* in einer nicht infizierten Kontrolle zu bestätigen. Nach 24 h bzw. 72 h wurde das Kulturmedium der Ansätze gesammelt und die RNA isoliert (2.2.3.2). Nachfolgend wurde die aufgereinigte RNA-Extrakte in einem Kit-basierten RT-PCR-Ansatz eingesetzt und amplifiziert (2.2.3.5), bei dem die RNA direkt in die entsprechenden DNA-Amplifikate umgeschrieben und nachfolgend detektiert wird. Für die Amplifikation wurden spezifische Primer für die 16S rRNA von *H. pylori* und für die RNA von RPLP0 der humanen mukogenen Magenschleimhautepithelzellen verwendet (2.2.3.5). Um die Kolonisierungseffizienz zu bestimmen, wurde der  $C_t$ -Wert von RPLP0 auf den  $C_t$ -Wert der 16S rRNA normalisiert (2.2.3.5, Gleichung 3). 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 21). Dies zeigte sich dadurch, dass die normalisierten  $C_t$ -Werte des Trojaners und des Wildtyps bei 24 h ( $\sim 1,6$ ) und 72 h ( $\sim 1,4$ ) auf einem gleichen Niveau liegen. Die Ergebnisse der Vehikelkontrolle bzw. Sterilkontrolle zeigten, dass kein  $C_t$ -Wert für die 16S rRNA von *H. pylori* ermittelt werden konnte (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 21: 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. Als Negativkontrolle wurde DPBS ohne Bakterien auf die Zellkultur gegeben (Daten nicht gezeigt). Die RNA wurde nach 24 h bzw. 72 h isoliert und nachfolgend wurde mittels RT-PCR der  $C_t$ -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  $C_t$ -Werte von RPLP0 zu 16S rRNA gebildet. Für den Infektionsversuch wurden je Infektionsansatz jeweils zwei unterschiedliche humane Spender verwendet. Die RT-PCR-Messung erfolgte in jeweils drei technischen Replikaten in Form von einem biologischen Replikat ( $n = 1$ ). Der relative  $C_t$ -Wert wurde als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt. MOI = *Multiplicity Of Infection*; WT = Wildtyp.

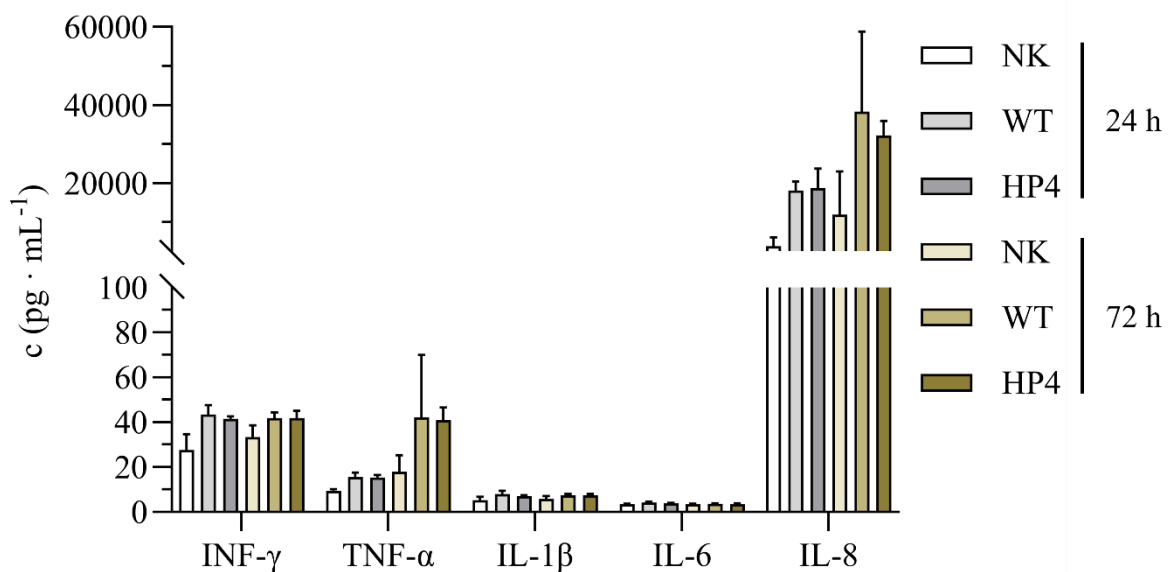
### 3.3.7 Immunantwort des Trojaners HP4

Neben der Bestimmung der Kolonisierungseffizienz (3.3.6) sollte zudem bewertet werden, ob die Deletion entsprechender Pathogenitätsfaktoren zu einer Reduktion der durch den Trojaner HP4 ausgelösten Immunantwort führt. Hierfür sollte der Zytokin-Titer aus den unter 3.3.6 erfolgten *in vitro* Infektionsversuchen bestimmt werden.

Die Quantifizierung des Zytokin-Titers infizierter und nicht-infizierter humaner mukogener Magenschleimhautepithelzellen von zwei unterschiedlichen Spendern aus dem Versuchsansatz 3.3.6 erfolgte direkt aus dem gesammelten Zellkulturmedium mittels Human Luminex<sup>®</sup> Discovery Assay (2.2.3.15), welcher freundlicherweise durch Christian Fehring (Universitätsklinikum Essen) durchgeführt wurde. IL-8 zeigte von allen fünf quantifizierten Zytokinen den höchsten Titer ( $\sim 10.000\text{--}40.000 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), wohingegen alle anderen quantifizierten Zytokine (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) im Mittel sehr niedrig ausfielen ( $< 50 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$  (Abbildung 22)). Weiterhin wurde ein leichter Anstieg des IL-8, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  Titers gegenüber der Negativkontrolle bestimmt (Abbildung 22). Sowohl nach 24 h als auch

nach 72 h Infektionszeit zeigten sich keine sichtbaren Unterschiede bei dem Wildtyp und Trojaner hinsichtlich der fünf quantifizierten Zytokine (Abbildung 22).

Insgesamt zeigte sich im Rahmen der Infektionsversuche, wie angestrebt, kein Unterschied hinsichtlich der Kolonisierungseffizienz des Trojaners HP4 gegenüber dem Wildtyp. Allerdings wurde keine Reduktion der quantifizierten Zytokine bestimmt, was darauf hindeutet, dass der Trojaner HP4 noch nicht ausreichend attenuiert ist. Daher muss der Stamm nachfolgend weiter hinsichtlich seiner Pathogenität optimiert werden.



**Abbildung 22: 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- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 mittels Human Luminex<sup>®</sup> Discovery Assay durch Christian Fehring (Universitätsklinikum Essen) 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*.

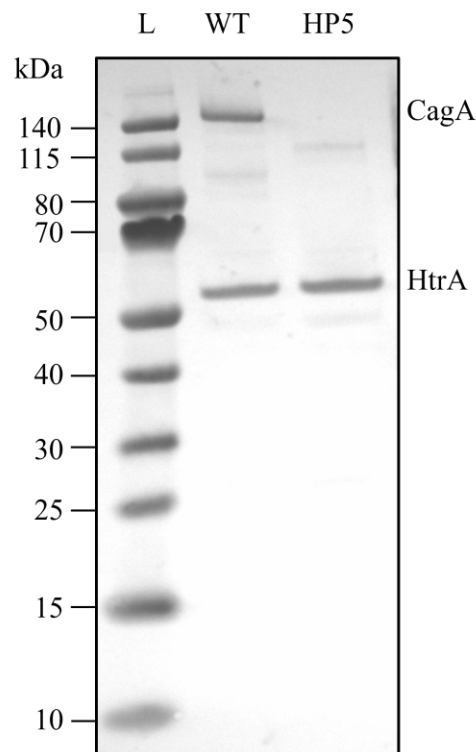
### 3.3.8 CagA-Immunodetektion

Neben VacA stellt CagA einen weiteren Hauptpathogenitätsfaktor von *H. pylori* dar, welcher indirekt an der Freisetzung bestimmter proinflammatorischer Zytokine beteiligt ist [48] und im Zusammenhang mit einem erhöhten Magenkrebsrisiko steht [49]. Da die Pathogenität des Trojaners bisher nicht ausreichend reduziert werden konnte (3.3.7), wurde entschieden zusätzlich auch den *cagA*-Locus mit dem generierten Deletionsplasmid pTZ17 zu deletieren (3.3.2). Ausgehend von einem Zellextrakt des Trojaners *H. pylori* HP5 sollte anschließend mittels Western-Blot bestätigt werden, dass der Knockout des *cagA*-Locus die Expression von

CagA verhindert. Neben dem CagA-Protein sollte als Kontrollprotein die essenzielle Serinprotease HtrA detektiert werden, welche unabhängig von dem Deletionsansatz durch den Wildtyp- und den Knockout-Stamm HP5 gebildet wird und im Western-Blot als Beladungskontrolle diene.

Für den immunologischen Nachweis des CagA-Proteins mussten zuerst Zellextrakte hergestellt werden. Hierfür wurden die Bakterienstämme *H. pylori* DSM 21031 und *H. pylori* HP5 auf HP-Agar kultiviert und der dichte Zellrasen des jeweiligen Stamms wurde für die Erstellung eines Zellextrakt verwendet (2.2.3.12). Im Anschluss wurden die Proteinbestandteile der Zellextrakte mittels SDS-PAGE getrennt (2.2.3.13) und die Bildung des CagA-Proteins wurde in einem Western-Blot durch den CagA3-Antikörper detektiert (2.2.3.14). Als Positivkontrolle wurde Kulturüberstand von *H. pylori* DSM 21031 mitgeführt, welcher das native CagA-Protein (~140 kDa) bildet. Als Beladungskontrolle wurde das HtrA-Protein (~55 kDa) mit dem HtrA-Antikörper detektiert. Sowohl die Probe des Wildtyps als auch die des Knockout Stamms HP5 zeigen auf dem Western-Blot eine Bande knapp oberhalb von 50 kDa (Abbildung 23). Weiterhin zeigt der Wildtyp, nicht aber der Knockout-Stamm HP5 eine Proteinbande oberhalb der Ebene der 140 kDa Bande des Protein-Größenmarkers (Abbildung 23). Darüber hinaus zeigen beide Proben schwache Banden mit einer molekularen Masse (Wildtyp ~100 kDa, HP5 ~115 kDa), die weder dem CagA- noch dem HtrA-Protein entspricht.

Insgesamt wurde anhand dieses Western-Blots der Knockout des Hauptpathogenitätsfaktors CagA im Trojaner HP5 bestätigt.



**Abbildung 23 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.

### 3.4 Schlussfolgerung Ergebnisse

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Arbeit der Trojaner HP5 ( $\Delta luxS$ ,  $\Delta vacA$ ,  $\Delta iceA2$ ,  $\Delta cagA$ ) erzeugt, welcher nicht mehr in der Lage ist AI-2 zu synthetisieren sowie die Hauptpathogenitätsfaktoren VacA, IceA2 und CagA zu exprimieren. Diese Trojanergeneration wurde bisher noch nicht hinsichtlich der Pathogenität und Kolonisierungseffizienz charakterisiert. Um eine signifikante Reduktion der Pathogenität zu erzielen, sind sehr wahrscheinlich weitere Deletionen von Pathogenitätsfaktoren erforderlich. Im Hinblick auf die Expression eines AMPs unter der Kontrolle eines regulierbaren AI-Promotors zeigte sich, dass nur AI-2 durch *H. pylori* synthetisiert werden. Daher muss eine AI-2-regulierbare Expressionskassette für die Trojaner-Strategie verwendet werden. Die AMPs LL-37 und Nisin A erwiesen sich als geeignete Kandidaten für die Eradizierung von *H. pylori*. Folglich sollte zukünftig versucht werden eine DNA-Sequenz der beiden ausgewählten AMPs in eine AI-2-regulierbare Expressionskassette zu klonieren und diese in das Genom des Trojaners zu integrieren.

## 4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, einen attenuierten *H. pylori*-Stamm zu entwickeln, der potenziell als *Drug-Delivery-System* geeignet sein kann, um am Infektionsort zielgerichtet AMPs freizusetzen (1.6). Hierfür wurden im Rahmen der Arbeit verschiedene AMPs im Hinblick auf ihre antimikrobielle Wirkung gegenüber *H. pylori* getestet und mögliche Off-Target Effekte untersucht. Weiterhin wurde die Bildung auf unterschiedliche AI-Typen analysiert, um perspektivisch im Bakterienstamm eine AI-regulierbare AMP-Expressionskassette verwenden zu können. Darüber hinaus wurden unterschiedliche Pathogenitätsfaktoren aus einem *H. pylori*-Stamm deletiert, um dessen Pathogenität zu reduzieren.

### 4.1 Screening nach wirksamen AMPs

In dieser Arbeit wurden im Gegensatz zu bisherigen Untersuchungen [103, 125-134] erstmalig unterschiedliche AMPs mit Wirksamkeit gegenüber *H. pylori* unter den gleichen Versuchskonditionen eingesetzt, um die antimikrobielle Wirkung gegenüber *H. pylori*, die zytotoxische und hämolytische Aktivität sowie die Pepsin Stabilität untereinander zu vergleichen. Zu Beginn wurden über Literaturrecherche ~50 AMPs identifiziert. Die Auswahl der näher zu untersuchenden AMPs orientierte sich in dieser Arbeit an den nachfolgenden Kriterien: Die AMPs sollten eine möglichst geringe MHK gegenüber *H. pylori* aufweisen, falls möglich nicht durch Pepsin hydrolysiert werden und keine posttranslationalen Modifikationen besitzen. Sollten mehrere Derivate eines wirksamen AMPs existieren, sollte nur das effizienteste ausgewählt werden. Die Zahl der hier untersuchten AMPs konnte von ~50 AMPs anhand der definierten Kriterien auf insgesamt 11 Kandidaten reduziert werden. Keines dieser AMPs wird in der Literatur als Pepsin-resistent beschrieben. Zusätzlich wurde die antimikrobielle Wirksamkeit zwei weiterer Peptide, BAMP und Buf IIIb [121], gegenüber *H. pylori* untersucht, welche den erwähnten Kriterien nicht entsprachen und dennoch mitgeführt wurden, da diese laut vorheriger Studien resistent gegenüber Pepsin sind, bei hohen Konzentrationen keine hämolytische Aktivität aufweisen und die Zellviabilität nicht beeinflussen [121, 122, 135]. Diese Eigenschaften wären vorteilhaft für eine Eradikation von *H. pylori*, da täglich 10 mg des Hauptverdauungsenzym Pepsin im menschlichen Magen synthetisiert werden [136] und eine Hydrolyse Pepsin-sensitiver AMPs sehr wahrscheinlich zum Aktivitätsverlust führen würde. Weiterhin soll der Trojaner in unmittelbarer Nähe zum Pathogen kolonisieren und dort AMPs freisetzen, wodurch die Viabilität der kolonisierten Magenepithelzellen beeinflusst würde. Eine antimikrobielle Wirksamkeit der Peptide BAMP und Buf IIIb gegenüber *H. pylori* wurde in der Literatur jedoch bisher noch nicht untersucht.

Da perspektivisch ein gegen *H. pylori* wirksames Peptid ohne Fehlfunktion heterolog im Trojaner exprimiert werden sollte und dieser Trojaner sehr wahrscheinlich nicht über notwendige posttranslationale Modifikationsmaschinerie verfügt, wurden vorrangig AMPs ohne solche Modifikationen untersucht. Als Ausnahme wurde Nisin A, trotz seiner vorhandenen Lanthionin-Ringe, in diese Arbeit mit aufgenommen, da dieses Peptid niedrige MHK gegen verschiedenen *H. pylori*-Stämme besitzt [134]. Für erste Versuchszwecke wurde die ausgewählten AMPs kommerziell als synthetische Peptide erworben. Im Rahmen eines ersten Screenings wurde die Wirksamkeit der 13 AMPs äquimolar gegenüber *H. pylori* getestet (3.1.1). Die Wirksamkeit der AMPs sollte anhand von Wachstumskinetiken durch eine Reduktion bzw. vollständige Hemmung des bakteriellen Wachstums beurteilt werden. Hierfür wurde das BioLector® Pro-System verwendet, welches den Vorteil bietet, dass Wachstumskinetiken im *Small-Scale* bei einem Kulturvolumen von 800–1900 µL unter mikroaerophilen Bedingungen über lange Zeiträume bei geringen Verdunstungseffekten in einem 48-Well-MTP-Format aufgenommen werden können. Unter den hier getesteten Peptid-Kandidaten erwiesen sich LL-37 und Nisin A als die effektivsten Kandidaten (3.1.1). LL-37 verringerte das Wachstum um ca. 80 %, während Nisin A das Wachstum um ca. 50 % reduzierte. Die Wirksamkeit von LL-37 ist nicht überraschend, da dieses AMP Teil der angeborenen humanen Immunantwort ist und dessen Expression durch humane Magenschleimhautzellen bei einer *H. pylori*-Infektion hochreguliert wird [103]. Zhang *et al.* zeigten, dass nach 48 h die OD<sub>595</sub> einer *H. pylori* SS1-Flüssigkultur bei einer Konzentration von 13,91 µM des AMPs LL-37 um ca. die Hälfte gehemmt wurde [137]. Eigene Untersuchungen bestätigen diese Ergebnisse, da bei einer Konzentration von 10 µM LL-37 die Kultur bereits nach 20 h die stationäre Phase erreichte, was in etwa einem Drittel des maximalen Wachstums der jeweiligen Vehikelkontrolle entspricht (Abbildung 6). Im Hinblick auf Nisin A wurde für den gleichen Stamm eine MHK von ~8 µM (25 µg · mL<sup>-1</sup>) beschrieben [134]. In Rahmen eigener Untersuchungen wurde das Wachstum bei 10 µM nicht vollständig gehemmt. Dies zeigte sich anhand der Wachstumskinetik durch eine exponentielle Phase mit einer geringeren Steigung und einer Biomasse in der stationären Phase, welche nur ca. der Hälfte der jeweiligen Kontrolle entsprach (Abbildung 6). Abweichungen eigener Ergebnisse zu der Literatur lassen sich vermutlich auf den unterschiedlichen Versuchsaufbau und die initiale Zellkonzentration im Assay zurückführen. Obwohl Hase *et al.* für drei von vier *H. pylori*-Stämmen eine bakterizide Wirkung von LL-37 nachweisen konnte [103], wären weitere Studien mit einer größeren Anzahl von Stämmen erforderlich, um die allgemeine Anwendbarkeit dieses AMPs für eine *H. pylori*-Eradizierung abzuschätzen. Im Gegensatz dazu zählt Nisin A zu den

Bakteriozinen mit einem breiten Wirkspektrum und Genera wie *Acinetobacter* und *Helicobacter* zeigen eine hohe Sensitivität gegenüber diesem AMP [138]. Die Sensitivität neun weiterer *H. pylori*-Stämme mit einer MHK zwischen  $\sim 0,06$  und  $4 \mu\text{M}$  ( $\sim 0,2$  und  $13,2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) deutet darauf hin [134, 138], dass Nisin A ein vielversprechender Kandidat zur Bekämpfung von *H. pylori*-Infektionen darstellt. Die Peptide Bicarinalin, Epinecidin-1 und TP4 hatten lediglich einen moderaten Einfluss auf das bakterielle Wachstum, was sich anhand der Wachstumskinetiken durch eine zeitlich verschobene, leicht abgeflachte exponentielle Phase und durch ein niedrigeres maximales Wachstum relativ zur Kontrolle sichtbar machte (Abbildung 5). Alle weiteren AMPs zeigten nahezu kaum oder gar keinen Einfluss auf das Wachstum von *H. pylori*. Eine Aktivität dieser AMPs würde vermutlich erst bei höheren Konzentrationen sichtbar, was jedoch experimentell bestimmt werden müsste. Anhand von Dosis-Wirksamkeitskurven gegenüber *H. pylori* wurden  $\text{IC}_{50}$ -Werte für Nisin A ( $\sim 11 \mu\text{M}$ ) und LL-37 ( $\sim 12 \mu\text{M}$ ) berechnet (3.1.2). Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte liefern präzisere Rückschlüsse darauf, bei welcher Konzentration des jeweiligen AMPs die eingesetzte *H. pylori*-Zellkonzentration zu welchem prozentualen Anteil eradiziert wird. Analog zu vorangegangenen Experimenten wurde das bakterielle Wachstum durch Nisin A bei  $10 \mu\text{M}$  um ca. die Hälfte gehemmt (3.1.1, Abbildung 6), was dem berechneten  $\text{IC}_{50}$  von  $\sim 11 \mu\text{M}$  sehr nahe kommt (3.1.2, Abbildung 8). Im Gegensatz dazu weicht der berechnete  $\text{IC}_{50}$ -Wert für LL-37 von  $\sim 12 \mu\text{M}$  (3.1.2, Abbildung 7) leicht von den vorherigen Ergebnissen ab, da das Wachstum von *H. pylori* durch  $10 \mu\text{M}$  LL-37 nicht um die Hälfte, sondern um ca. ein Drittel reduziert wurde (3.1.1, Abbildung 6). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass bei der Dosis-Wirksamkeitskurve bei der Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  eine erhöhte Standardabweichung vorliegt (3.1.2, Abbildung 7), wodurch der ermittelte  $\text{IC}_{50}$  wiederum höher ausfällt. Im Gegensatz zu dem in der Literatur von Hase *et al.* angegebenen  $\text{IC}_{50}$  von  $1,4 \mu\text{M}$  für LL-37 [103], ergaben eigene Untersuchungen einen höheren Wert von  $10 \mu\text{M}$ . Die Diskrepanz zu dem Literaturwert lässt sich sehr wahrscheinlich darauf zurückführen, dass sich der eigene Versuchsaufbau zu den Arbeiten von Hase *et al.* stark unterscheidet. Für LL-37 konnte in der Literatur kein weiterer  $\text{IC}_{50}$ -Wert ermittelt werden. Ebenso wurde kein Vergleichswert für den hier berechneten  $\text{IC}_{50}$  von Nisin A in der aktuellen Literatur gefunden.

Weiterhin wurde die Sensitivität der AMPs gegenüber dem im humanen Magen vorliegenden Enzym Pepsin getestet, da durch eine Hydrolyse der Peptidsequenz die antimikrobielle Wirksamkeit in der Regel eliminiert wird, was im Hinblick auf die verfolgte *Drug-Delivery*-Strategie zu einem Problem werden kann. Pepsin hydrolysiert vorzugsweise Bindungen mit aromatischen Resten oder Leucin in P1 oder P1' Position [139], wobei die benachbarten

Aminosäuren die Hydrolyse positiv oder negativ beeinflussen können. Die Untersuchungen zeigten, dass unter Magen-ähnlichen Bedingungen alle Peptidsequenzen mit Ausnahme von Buf IIIb mindestens einmal durch Pepsin hydrolysiert werden (3.1.5). Eine antimikrobielle Wirkung von Buf IIIb sowie von BAMP gegenüber *H. pylori* ist in der Literatur nicht beschrieben und konnte im Rahmen dieser Arbeit bei der getesteten Konzentration nicht nachgewiesen werden (3.1.1). Das bedeutet, dass von den gegen *H. pylori* wirksamen AMPs am Wirkort im Magen aufgrund der Hydrolyse durch Pepsin nur eine eingeschränkte oder ausbleibende antimikrobielle Wirksamkeit erwartet werden kann. Ob die AMPs tatsächlich im Magen hydrolysiert werden, bevor diese ihre antimikrobielle Wirkung entfalten können, bleibt experimentell zu bestimmen. Hierfür wäre es sinnvoll, ein *in vitro* Magenmodell zu verwenden, welches die Bedingungen im menschlichen Magen möglichst realistisch abbildet. So könnte beispielsweise das bereits in dieser Arbeit verwendete Magenmodell mit *H. pylori* infiziert werden (2.2.2.4), um die Stabilität der jeweiligen AMPs gegenüber Pepsin zu untersuchen. Ob eine Hydrolyse der AMPs tatsächlich vorliegt, könnte mittels LC-MS bewertet werden (2.2.4.7). Für den Fall, dass die AMPs hydrolysiert werden, bevor diese ihre Wirkung entfalten können, könnte perspektivisch mittels Protein-Engineering die Peptidsequenz angepasst werden. Beispielhaft für LL-37 zeigte ein AMP-Derivat EFK17 eine reduzierte proteolytische Sensitivität und erhöhte antimikrobielle Wirkung durch die Aminosäure-Substitution spezifischer Positionen gegen Tryptophan [140]. Über C-terminale Tryptophan oder Phenylalanin-reiche Peptidverlängerungen lässt sich ebenfalls die proteolytische Stabilität erhöhen [141]. Eine weitere Möglichkeit, um eine Pepsin Hydrolyse zu verzögern, damit das AMP seine antimikrobielle Wirkung entfalten kann, besteht in der Kopplung des Peptids an ein Fusionsprotein wie zum Beispiel an Humanserumalbumin, welches das AMP sterisch von Pepsin abschirmt. Die Fusion an einen solchen Partner wurde bereits anhand eines humanen Lactoferrins beschrieben, wodurch dessen Stabilität gegenüber Pepsin erhöht wurde [142]. Da eine N- bzw. C-terminale Kopplung eines Fusionsproteins an ein AMP sowie die Modifikation der Peptidsequenz des AMPs die antimikrobielle Aktivität sehr wahrscheinlich beeinflussen würde, wäre ein Vergleich der Wirksamkeit jeglicher Konstrukte mit dem ursprünglichen AMP notwendig.

Um die Sicherheit der AMPs für die Anwendung im Menschen zu bewerten, wurde die Toxizität aller AMPs gegenüber humanen Magenschleimhautzellen und humane Erythrozyten unter äquimolarer Konzentration vergleichend untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die AMPs Epinecidin-1 und TP4 einen Einfluss auf die Viabilität der humanen Magenschleimhautzellen (3.1.3) und Nst1, TP4 und Epinecidin-1 hämolytische Aktivität

zeigten (3.1.4). Nisin A und LL-37 zeigten bei der getesteten Konzentration keine Off-Target Effekte (3.1.3, 3.1.4). Anhand dieser Ergebnisse lassen sich jedoch nur Rückschlüsse darauf ziehen, welche AMPs bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  keine Off-Target Effekte zeigen.  $\text{IC}_{50}$ -Werte für LL-37 und Nisin A gegenüber Magenschleimhautzelllinien und humanen Erythrozyten konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Um eine Bewertung der Toxizität für beide Targets auch im Hinblick auf eine im Magen optimal eradizierende Konzentration gegen *H. pylori* vornehmen zu können, sollten zukünftig entsprechende Dosis-Wirksamkeitskurven aufgenommen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen das Potenzial von LL-37 und Nisin A zur Behandlung von *H. pylori*-Infektionen. Aktuell existieren jedoch keine klinischen Studien, welche die Sicherheit dieser AMPs im Kontext einer *H. pylori*-Infektion näher untersuchen. Erste Daten für die Sicherheit von LL-37 lieferte eine klinische Phase IIb Studie (HEAL LL-37) zur Behandlung von venösen Beingeschwüren, bei der die lokal getesteten Dosen von 0,5 und 1,6  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $\sim 111$  bzw.  $356 \mu\text{M}$ ) von LL-37 sicher und verträglich waren [108]. Dies entspricht der ca. zehnfachen bzw. dreißigfachen Konzentration des in dieser Arbeit ermittelten  $\text{IC}_{50}$  von  $12 \mu\text{M}$  für LL-37 gegenüber *H. pylori* (3.1.2). Nisin A ist bereits als Nahrungskonservierungsmittel zugelassen und trägt den *Generally Recognized As Safe* Status. Daten aus klinischen Studien spezifisch für Nisin A existieren noch nicht. Allerdings werden aktuell Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom für eine klinische Phase I/IIa Studie (NCT06097468) rekrutiert, bei der die Toleranz von Nisin Z erprobt und der Einfluss auf das orale Mikrobiom erforscht wird. Diese Studienergebnisse könnten zukünftig einen ersten groben Anhaltspunkt für eine Verträglichkeit von Nisin A dienen, da sich Nisin Z von Nisin A lediglich durch eine Aminosäuresubstitution unterscheidet und die MHK-Werte für beide AMPs anhand von drei Bakterienstämmen übereinstimmen [143].

Zu Beginn der hier vorgestellten Arbeiten wurde ausgehend von ca. 50 AMPs eine Anzahl von 13 Peptiden ausgewählt, deren antimikrobielle Wirkung gegenüber *H. pylori* näher untersucht werden sollte. Diese Kandidaten wurden unter anderem aufgrund der in der Literatur beschriebenen niedrigen MHK ausgewählt [103, 125-134]. Die Bestimmung der antimikrobiellen Wirkung erfolgt in diesen Publikationen oftmals anhand verschiedener *H. pylori*-Stämme mit unterschiedlichen Assays, wie der Agar-Dilution- und Broth-Dilution-Methode gemäß CLSI Guideline [144], oder anhand selbst entwickelter Analyseansätze. Die Ergebnisse dieser Publikationen liefern zwar Anhaltspunkte bezüglich einer Wirksamkeit eines untersuchten AMPs, aber aufgrund der stark variierenden Assay-Bedingungen lassen sich keine vergleichenden Rückschlüsse bezüglich der Wirksamkeit der AMPs untereinander ziehen.

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig die antimikrobielle Wirksamkeit der ausgewählten AMPs gegenüber *H. pylori* unter standardisierten Versuchsbedingungen (2.2.1.4) untersucht, um besonders wirksame Peptide zu identifizieren. Einige AMPs wie zum Beispiel das Peptid PGLa-AM1 zeigten in dieser Arbeit nach 48 h bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  keine antimikrobielle Wirkung (3.1.1), wohingegen in den Arbeiten von Zhang *et al.* bereits nach 30 min bei einer ähnlichen Konzentration von  $\sim 8 \mu\text{M}$  ( $16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) eine vollständige Eradizierung von *H. pylori* beschrieben wurde [131]. Neben der eigentlichen Methode zur Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität und der Auswahl des jeweiligen Stamms bilden die Reinheit des Peptids, eine C-terminale Amidierung und die Faltung wichtige Faktoren, welche die antimikrobielle Wirkung beeinflussen können. Die Synthese von PGLa-AM1 in der Arbeit von Zhang *et al.* erfolgte rekombinant in einem *E. coli*-basierten Expressionssystem [131]. Die Expression dieses AMP resultierte in einem nativen Zustand mit einer Peptid-Reinheit von  $\geq 90 \%$  [131]. Angaben zu einer C-terminalen Amidierung wurden jedoch nicht beschrieben. Alle AMPs, mit Ausnahme von Nisin A, wurden in dieser Arbeit mit einer Reinheit von  $\geq 95 \%$  erworben. Weiterhin bestätigt die Qualitätskontrolle des Synthesedienstleisters das Vorhandensein einer C-terminalen Amidierung. In den Arbeiten von McLean *et al.* wurde PGLa-AM1 wie in den eigenen Arbeiten per Syntheseauftrag erstellt und zeigte eine identische Aminosäuresequenz mit C-terminaler Amidierung und einen ähnlichen Reinheitsgrad von  $> 98 \%$  [145]. Da McLean *et al.* die Wirksamkeit von PGLa-AM1 gegenüber mehreren oralen und respiratorischen Pathogenen beschrieb [145], lässt sich die Faltung sowie die C-terminale Amidierung und Reinheit als Fehlerquelle ausschließen. Somit lassen sich Diskrepanzen in der Wirksamkeit der Peptide zu bisherigen Untersuchungen vermutlich auf den unterschiedlichen Versuchsaufbau zur Bestimmung der antimikrobiellen Wirkung zurückführen und darauf, dass die Wirksamkeit des gleichen AMPs gegenüber unterschiedlicher *H. pylori*-Stämme variieren kann [103]. In vielen Publikationen wird die antimikrobielle Wirksamkeit mit einer Massenkonzentration angegeben, wodurch sich allerdings keine vergleichenden Rückschlüsse ziehen lassen. Da AMPs oftmals eine Größe zwischen 12 und 50 Aminosäuren aufweisen, wäre die Angabe der Molarität sinnvoller als die Angabe der Massenkonzentration, vorausgesetzt, dass die Peptidsequenz bekannt ist. Um eine bessere Vergleichbarkeit der AMPs untereinander zu gewährleisten, wurde in dieser Arbeit die Stoffmengenkonzentration der AMPs angegeben. Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Dissertation erstmalig die Wirksamkeit von 13 AMPs gegenüber *H. pylori* unter standardisierten Versuchsbedingungen untersucht und verglichen werden. Hierdurch ergibt sich gegenüber den bisherigen Untersuchungen ein wissenschaftlicher Mehrwert, insbesondere, da neben der Untersuchung der antimikrobiellen

Wirksamkeit gegenüber *H. pylori* auch vergleichende Untersuchungen zur zytotoxischen und hämolytischen Aktivität sowie der Pepsin-Stabilität erfolgten. Es konnten demnach zwei AMPs (LL-37 und Nisin A) identifiziert werden, die für eine spätere therapeutische Anwendung in Betracht kommen. Ihre Eignung ergibt sich daraus, da bereits die Anwendung beider Peptide bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zu einer starken Reduktion des *H. pylori*-Wachstums führten und in separaten Untersuchungen bei der gleichen Konzentration keine zytotoxische und hämolytische Aktivität hervorgerufen wurde. Perspektivisch sind dosisabhängige Wirksamkeitsstudien hinsichtlich der zytotoxischen und hämolytischen Aktivität jedoch erforderlich, um das vollständige Spektrum der Wirkung beider AMPs für eine zukünftige therapeutische Anwendung zu verstehen.

### 4.2 Untersuchung auf Bildung verschiedener AI-Typen

Perspektivisch sollte ein AI-regulierbare Expressionskassette in das Genom des Trojaners integriert werden, welche eine DNA-Sequenz für ein AMP beinhaltet. Grundsätzlich existieren vier verschiedene Typen an AI, welche für die Regulation verwendet werden könnten: AI-1, AI-2, AI-3 und AIPs. Letztere sollten in dieser Arbeit nicht untersucht werden, da AIPs hauptsächlich durch Gram-positive Bakterien gebildet werden [146] 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 [78]. Die Bildung von AI-2 wurde in dieser Arbeit ebenfalls nachgewiesen (3.3.3). Daher wurde zu Beginn dieser Arbeit durch Kooperationspartner Quh-Lab Lebensmittelsicherheit freundlicherweise eine AI-2-regulierbare Reporter-kassette zur Verfügung gestellt. Diese besteht aus einem LsrR-regulierbaren Promotor  $P_{\text{Lsr}}$  und einer nachgeschalteten Reporter-kassette (2.1.5). Liegt AI-2 vor, so bindet dieses an den Repressor LsrR, wodurch dieser inaktiviert wird [147] und die Expression der Reporter-kassette ermöglicht wird. Da jedoch Daten des Kooperationspartners zeigten, dass der AI-2-regulierbare Promotor eine hohe Basalexpression aufweist (Daten nicht gezeigt), zudem das Lsr-Regulationssystem recht komplex ist und die AI-2-Vorstufen in einer komplexen Gleichgewichtsreaktion stehen [79], sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob ein anderes, weniger komplexes AI-basiertes Regulationssystem für *H. pylori* in Betracht gezogen werden kann. Daher sollte geprüft werden, ob *H. pylori* AI-1 und/oder AI-3 bildet, um auf alternative AI-induzierbare Promotoren auszuweichen und somit die Arbeiten flexibler aufzustellen. Ein sensitives AI-1-induzierbares Biolumineszenz-Reportersystem konnte am Fraunhofer IME bereits erfolgreich etabliert werden [123] und würde im Falle einer AI-1-Synthese durch *H. pylori* zur Verfügung stehen.

Da eine Vielzahl unterschiedlicher AI-1-Moleküle existiert [146], wovon nicht alle als kommerzielle Standards zur Verfügung standen und zudem aus Kostengründen sich die Auswahl auf eine kleine Menge beschränken musste, wurde im Rahmen dieser Arbeit fünf gängige AI-1-Standards mit unterschiedlich langem Acylrest ausgewählt (Tabelle 22), um das AI-1-Spektrum bestmöglich abzudecken. AI-1-Moleküle bestehen aus einem fünfgliedrigen Lactonring und einer variablen linearen Acylgruppe. Anhand der verwendeten *Untargeted* LC-MS/MS-Methode (2.2.4.4) wurde dieser charakteristische Lactonring detektiert, weshalb auch AI-1-Moleküle, welche nicht als Standards mitgeführt wurden, detektiert wurden. Die hier durchgeführten Versuche mittels LC-MS/MS-Analytik zeigten, dass keine der AI-1-Moleküle durch *H. pylori* synthetisiert werden, die als Standard mitgeführt wurden (3.2.1). Weiterhin wurde gezeigt, dass der Bakterienstamm *Y. enterocolitica* DSM 11503 (Positivkontrolle) AI-1 bildet und dass vier von fünf AI-1-Standards mit einer Konzentration von 41–58 nM aus dem *H. pylori*-Kulturmedium mittels LC-MS/MS detektiert wurden (3.2.1). Konzentrationen von AI-1 in Bakterienkulturen variieren zwischen dem niederen nanomolaren und dem niederen mikromolaren Konzentrationsbereich [123, 148]. Daher ist es auch möglich, dass die Sensitivität der LC-MS/MS-Analytik nicht ausreichend war, um die gebildeten AI-1-Konzentrationen von *H. pylori* zu detektieren. Eine Bestimmung der unteren Nachweisgrenze für die jeweiligen AI-1-Moleküle wurde nicht durchgeführt. In dieser Arbeit wurde eine *Untargeted* LC-MS/MS-Methode von Patel *et al.* verwendet [149]. Vier von den fünf hier verwendeten AI-1-Standards wurden in den Arbeiten von Patel *et al.* mit einer Nachweisgrenze zwischen 0,6 und 229,6 nM detektiert [149]. Da die verwendete Methode auf den Arbeiten von Patel *et al.* basiert, kann in dieser Arbeit von einer vergleichbaren Nachweisgrenze ausgegangen werden, weshalb eine unzureichende Sensitivität als Fehlerquelle zur Detektion von AI-1 wahrscheinlich ausgeschlossen werden kann. Für beide Bakterien-Stämme wurde nach 24 h die OD<sub>600</sub> der Flüssigkultur bestimmt. Hierbei wies die *Y. enterocolitica*-Kultur eine etwa dreifach höhere OD<sub>600</sub> auf als die der *H. pylori*-Kultur (3.2.1). Anhand von publizierten Daten des Fraunhofer IME wurde bereits unter Verwendung des gleichen *Y. enterocolitica*-Stamms mit der gleichen LC-MS/MS Methode AI-1 in Abhängigkeit von der Zellkonzentration quantifiziert [123]. Anhand dieser publizierten Daten lässt sich abschätzen, dass in einer *Y. enterocolitica*-Probe mit einer vergleichbaren OD<sub>600</sub> zur *H. pylori*-Kultur die Analytik zuverlässig entsprechende AI-1-Moleküle hätte detektieren müssen. Zusammenfassend kann somit davon ausgegangen werden, dass *H. pylori* keine dieser AI-1-Moleküle bildet. Alternativ könnte auch ein Biosensor-basierter Ansatz zur simultanen Detektion von AI-1 aus Kulturüberständen verwendet werden, welcher im Vergleich zur LC-MS/MS-Analytik eine höhere Sensitivität

aufweist und eine Nachweisgrenze für einen der in dieser Arbeit verwendeten AI-1-Standard zwischen 0,17 und 0,50 nM zeigt [123].

Neben AI-1 und AI-2 bilden viele Bakterien weitere Klassen von Botenstoffen. Aus diesem Grund sollte auch untersucht werden, ob AI vom Typ 3 von *H. pylori* gebildet werden. Nach aktuellem Stand der Literatur ist die Bildung von AI-3 durch *H. pylori* bisher nicht beschrieben. Weiterhin wird auf eine AI-3-Bildung untersucht, da bekannt ist, dass humanpathogene *E. coli*-Stämme diesen AI-Typ bilden [76], einige Pyrazinone durch die Inhibierung humaner Proteasen an der Pathogenese beteiligt sind [150, 151] und eine inflammatorische Immunantwort auslösen [152]. Für die Analytik wurden freundlicherweise durch Prof. Crawford (Yale University) sieben von acht der hier verwendeten AI-3-Standards bereitgestellt, welche bereits in *E. coli* detektiert wurden [76]. Ein weiterer Standard wurde kommerziell erworben. Für zwei der zur Verfügung gestellten Standards stand keine Information bezüglich der Masse zur Verfügung (Tabelle 22), weshalb diese direkt gelöst und mit unbekannter Konzentration in den Versuchen eingesetzt wurden. In den eingesetzten Konzentrationen konnten alle Standards mittels LC-MS/MS-Analytik detektiert werden (3.2.2, 7.1). Während sich die jeweiligen AI-3-Standards in den gespikten Proben mit der Analytik zuverlässig detektieren ließen, konnte in den Kulturüberständen von *H. pylori* keine entsprechende AI-3-Moleküle nachgewiesen werden (3.2.2, 7.1). Sowohl für die AI-2- als auch für die AI-3-Messung wurde nach 24 h die OD<sub>600</sub> der jeweiligen *H. pylori*-Flüssigkultur bestimmt. Der OD<sub>600</sub>-Wert der Flüssigkultur für den AI-3-Nachweis war dabei um ca. den Faktor zwei größer (3.2.2) als bei der AI-2-Messung (3.3.3). Da AI mit einer zunehmenden Zelldichte in ihre Umgebung akkumulieren [74] und im Zuge des AI-2-Nachweises bei einer geringeren Zelldichte eine hohe AI-2-Konzentration gemessen wurde, wäre auch ein deutliches Signal für die jeweiligen AI-3-Standards zu erwarten. Da jedoch kein Signal für die entsprechenden AI-3-Standards in der *H. pylori*-Probe detektiert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass *H. pylori* die hier untersuchten AI-3-Moleküle nicht als *Quorum Sensing* Signalmoleküle verwendet.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit die ersten analytischen Untersuchungen auf Bildung von AI-1 und AI-3 durchgeführt mit dem Ergebnis, dass *H. pylori* nur AI des Typ AI-2 synthetisiert. Da nach aktuellem Stand der Literatur keine Daten existieren, welche die Synthese von sowohl AI-1 als auch AI-3 durch nahe Verwandte Gattungen wie *Campylobacter* bestätigen, kann davon ausgegangen werden, dass *H. pylori* diese nicht bildet. Somit kann nur AI-2 für die induzierende Wirkung einer AI-regulierbaren Kasette im Trojaner in Betracht gezogen werden. Folglich sollte zukünftig das AI-2-regulierbare Reportersystem verwendet

werden (2.1.5), wobei der Reporter perspektivisch als Platzhalter für eine gegen *H. pylori* wirksame AMP DNA-Sequenz dient.

### 4.3 Von der Mythologie zur Forschung: Entwicklung eines trojanischen *H. pylori*

Inspiziert 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 weiteres Ziel dieser Arbeit einen scheinbar harmlosen attenuierten trojanischen *H. pylori* zur Bekämpfung einer *H. pylori*-Infektion zu entwickeln. Dieser bakterielle Trojaner soll sich unbemerkt neben dem im Magen vorliegenden Pathogen ansiedeln und in unmittelbarer Nähe eine eradizierende Substanz freisetzen. Dieser zeichnet sich dadurch aus, dass dieser 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. Perspektivisch sollte zunächst eine AI-2-regulierbare Reporter-kassette im Trojaner integriert werden, um die Induzierbarkeit durch *H. pylori*-spezifische Botenstoffe zu demonstrieren und die Reporter-kassette später gegen eine AMP-Kassette auszutauschen. Um eine Selbstinduktion durch AI-2 zu verhindern, musste daher dessen Biosynthese unterbunden werden. Nachfolgend sollten humane mukogene Magenschleimhautzellen mit dem Trojaner und Wildtypstamm infiziert werden, um die Bakterien-induzierte Immunantwort und die Kolonisierungseffizienz der Stämme zu vergleichen.

#### 4.3.1 Erzeugung von Deletionen und Charakterisierung der Knockout-Stämme

Da eine direkte Quantifizierung von Furanosylboratdiester (AI-2) mit konventionellen Methoden nicht möglich ist, erfolgte in dieser Arbeit eine indirekte Quantifizierung über derivatisiertes DPD, einer Vorstufe des AI-2. Hierzu wurden Proben aus dem Schüttelkolben der Flüssigkulturen entnommen und mittels LC-MS/MS analysiert. Dabei ergab sich für den Wildtyp-Stamm eine gemittelte DPD-Konzentration von ca. 16  $\mu\text{M}$  (3.3.3), welche einem in der Literatur beschriebenen Wert von 7  $\mu\text{M}$  sehr nahe kommt [153]. Leichte Abweichungen der eigenen Ergebnisse zu den von Wen *et al.* lassen sich möglicherweise darauf zurückführen, dass für die DPD-Quantifizierung ein Biosensor-basierter Ansatz verwendet wurde [153]. Um die Extraktionseffizienz zu beurteilen, wurde zusätzlich DPD in PBS und in das verwendete *H. pylori*-Kulturmedium formuliert, wobei eine Wiederfindungsrate von DPD im Kulturmedium gegenüber PBS von ca. 44 % berechnet wurde (Daten nicht gezeigt). Für die

Kultivierung von *H. pylori* wurde HP-Medium (Tabelle 20) verwendet, ein komplex Medium, welches FKS als Zusatz beinhaltet. Während der Extraktion von AI-2 aus dem Kulturmedium wurde eine deutlich sichtbare weiße Schicht zwischen dem Extrakt und dem Raffinat beobachtet, was sich vermutlich auf den hohen Proteingehalt des Mediums zurückführen lässt. Die geringe Wiederfindungsrate lässt sich somit sehr wahrscheinlich durch einen Matrixeffekt begründen, wodurch die Extraktionseffizienz beeinflusst wurde. Die Kultivierung von *H. pylori* ohne FKS im Kulturmedium war bisher in eigenen Versuchen nicht möglich, weshalb auf ein alternatives Kulturmedium nicht zurückgegriffen werden konnte. Aufgrund der geringen Wiederfindungsrate von DPD aus dem *H. pylori*-Kulturmedium kann daher davon ausgegangen werden, dass tatsächlich eine deutlich höhere AI-2-Konzentration als ca. 16  $\mu\text{M}$  vorgelegen hat. Um das Problem der Extraktionseffizienz zu umgehen, könnte alternativ zu der hier verwendeten LC-MS/MS-Methode auf einen Biosensor-basierten Assay zurückgegriffen werden. Hierfür wird die AI-2-Konzentration über die Induktion der Biolumineszenz in einem Reporterstamm nach Zugabe zellfreier *H. pylori*-Kulturüberstände bestimmt [153, 154]. Der Knockout-Stamm *H. pylori* HP2 ( $\Delta luxS$ ) zeigte in Übereinstimmung mit der Literatur [153, 155] gegenüber dem Wildtyp-Stamm eine stark signifikante Reduktion der DPD-Biosynthese (3.3.3). LuxS ist ein integraler Bestandteil des aktiven Methylzyklus bei dem das Intermediat *S*-Adenosylmethionin gebildet wird [83, 155], welches unter anderem für essenzielle Zellprozesse wie Protein- und Nukleinsäure-Methylierung verwendet wird. Die verbleibende DPD-Konzentration des Trojaners lässt sich daher vermutlich auf den weiterhin aktiven Methylzyklus von *H. pylori* zurückführen, bei dem DPD ohne die katalytische Funktion des LuxS-Proteins als Nebenprodukt gebildet wird. Inwiefern die verbleibende DPD-Konzentration des Trojaners später einen Einfluss auf eine AI-2-regulierbare Expressionskassette haben könnte, bleibt experimentell zu bestimmen. Dies kann beispielsweise durch einen direkten Vergleich einer AI-2-regulierbaren Reporter-kassette in An- und Abwesenheit von DPD erfolgen. Die Kultivierung von *H. pylori* wurde in dieser Arbeit unter optimierten Laborbedingungen durchgeführt. In welcher Quantität sowohl der Trojaner bei einer Anwendung im Magen als auch *H. pylori* bei persistent infizierten Patienten tatsächlich AI-2 unter den harschen Bedingungen des menschlichen Magen bilden, bleibt experimentell zu bestimmen. Als ersten Anhaltspunkt könnten hierfür *in vitro* Infektionsversuche mit den in dieser Arbeit verwendeten humanen mukogenen Magenschleimhautzellen (2.2.2.4) durchgeführt werden, um anschließend AI-2 aus dem Mukus zu extrahieren (2.2.4.2) und mittels LC-MS/MS zu quantifizieren (2.2.4.5). Unter der Annahme, dass diese *in vitro* Daten eine ausreichende AI-2-Konzentration bei einer *H. pylori*-Infektion bestätigen, welche die

Funktion der AI-2-regulierbaren Expressionskassette gewährleistet, sollten perspektivisch diese Versuche erneut in einem Mausmodell validiert werden. Ausgehend von diesen Daten kann die *in vivo* Relevanz einer AI-2-regulierbaren Expressionskassette bewertet werden.

Für die Entwicklung eines Trojaners sollten neben der AI-2-Synthese vor allem die Hauptpathogenitätsfaktoren *vacA*, *cagA* und *iceA2* aus dem Genom von *H. pylori* entfernt werden. Hoch virulente *H. pylori*-Stämme des Typ-I sind *vacA*<sup>+</sup>, wohingegen weniger virulente Stämme kein funktionales VacA-Protein ausbilden [37]. Um die Bildung von VacA vollständig zu unterbinden und so einen weniger virulenten Stamm zu entwickeln, wurde in dieser Arbeit der gesamte *vacA*-Locus deletiert (3.3.2). Ein anschließender qualitativer Nachweis des VacA-Proteins aus den normalisierten Überständen von Schüttelkolben-Flüssigkulturen des *H. pylori* Wildtyp- und Knockout-Stamms HP3 erfolgte mittels SPR (3.3.4). Die Ergebnisse bestätigen, dass VacA durch den Wildtyp- nicht aber durch den Knockout-Stamm HP3 gebildet wird (3.3.4) und korrelieren mit den von Kuck *et al.* publizierten Daten. Dort wurde mittels Western-Blot gezeigt, dass die Bildung von VacA in der Probe eines Wildtyp-Stamms, nicht aber in der des isogenen Knockout-Stamms, detektiert werden kann [156]. Ein direkter Nachweis der fehlenden vakuolisierenden Aktivität beispielsweise anhand der Infektion einer Zellkultur mit dem Trojaner wurde nicht durchgeführt. Die Mutagenese spezifischer Sequenzabschnitte innerhalb des *vacA*-Locus führt bereits zum Verlust der vakuolisierenden Aktivität von VacA [54]. Da in dieser Arbeit der *vacA*-Locus vollständig deletiert wurde, ist es äußerst unwahrscheinlich, dass eine verbleibende vakuolisierende Aktivität weiterhin vorliegt.

Eine Deletion des *iceA2*-Locus wurde in dieser Arbeit durchgeführt, da IceA2<sup>+</sup>-Stämme die Bildung von pro-inflammatorische IL-1-Polymorphismen stimulieren, welche in Assoziation mit einem erhöhten Risiko präkanzeröser Läsionen der Magenschleimhaut stehen [157]. Zusätzlich stehen *cagA*<sup>+</sup>-Stämme mit einem bestimmten *vacA*-Genotyp und *iceA*-Allel in Assoziation eine verstärkte Immunantwort auszulösen [158]. Es ist bekannt, dass der *iceA2*-Locus für das Protein IceA2 codiert, jedoch ist dessen Funktion jedoch unbekannt [72]. Da keine Antikörper für einen immunologischen Nachweis zur Verfügung standen, konnte die Deletion nur mittels Sequenzierung verifiziert werden. Anhand der Sequenzierungsergebnisse wurde die Deletion des *iceA2*-Locus bestätigt (3.3.5). Hierbei zeigte sich, dass teils homologe DNA-Sequenzabschnitte innerhalb des deletierten *iceA2*-Locus des Stamms *H. pylori* HP4 gegenüber dem Stamm mit dem nativen Locus vorliegen. Diese homologen Sequenzen sind nicht auf eine unvollständige Deletion zurückzuführen, sondern entstehen durch den eigentlichen Deletionsprozess. Hierfür wurde ein Plasmid verwendet, welches auf dem Rekombinase *difH*/XerH-System von Debowski *et al.* aufbaut [117]. Im ersten Schritt wird der

zu deletierende Locus durch eine *Selection/Counter-Selection*-Kassette im Genom ersetzt. Die Kassette wird dabei von zwei *difH*-Sequenzen flankiert, welche die ortsspezifische Rekombination durch die *H. pylori*-Rekombinase XerH ermöglicht. In einem nachfolgenden Gegenselektionsschritt entfernt XerH über die *difH*-Sequenzen die Kassette aus dem Genom. Das resultierende chromosomale Rekombinationsprodukt ist eine markerlose Deletion mit Sequenzrückständen die aus einer *difH*-Erkennungssequenz [117] und aus wenigen Basenpaaren des Plasmid-Rückgrats besteht. Im Falle dieser Deletion zeigen diese Sequenzrückstände eine gewisse Homologie zum nativen *iceA2*-Locus (Abbildung 20). Um polare Effekte zu verhindern und somit die Expression distal gelegener Gene nicht zu beeinflussen, wurden die ersten fünf und die letzten 21 Basenpaare des *iceA2*-Locus nicht entfernt. Obwohl innerhalb des *iceA2*-Locus Sequenzrückstände vorliegen, kann von einer vollständigen Inaktivierung ausgegangen werden.

Zusammenfassend wurde der Trojaner *H. pylori* HP4 entwickelt. Dieser Triple Knockout-Stamm ist nicht mehr in der Lage AI-2 zu synthetisieren und die Hauptpathogenitätsfaktoren VacA und IceA2 zu exprimieren. Ausgehend von diesem Stamm sollten erste Infektionsversuche anhand von humanen Magenschleimhautzelllinien durchgeführt werden.

### 4.3.2 Trojaner vs. Wildtyp: Analyse der Immunogenität und Kolonisierungseffizienz

Um die Auswirkungen der Deletionen auf die bakterielle Kolonisierungseffizienz sowie die ausgelöste humane Immunantwort zu bewerten, wurden humane mukogene Magenschleimhautzellen mit dem Trojaner HP4 und dem Wildtyp-Stamm infiziert. Ursprünglich sollten die Infektionsversuche in drei biologischen Replikaten durchgeführt werden. Aus zeitlichen Gründen konnte die Durchführung der Infektionsversuche nur in einem biologischen Replikat erfolgen, weshalb die Ergebnisse nur als Anhaltspunkt gesehen werden sollten. Die Ergebnisse zeigten, dass durch die eingeführten chromosomalen Deletionen im Trojaner HP4 ( $\Delta luxS$ ,  $\Delta vacA$ ,  $\Delta iceA2$ ) die Kolonisierungseffizienz relativ zum Wildtyp nicht negativ beeinflusst wird (3.3.6). Eine Reduktion der Immunantwort konnte jedoch durch die Entfernung der Loci der Pathogenitätsfaktoren VacA und IceA2 nicht bestätigt werden (3.3.7). Im Hinblick auf VacA lassen sich die Ergebnisse vermutlich dadurch begründen, dass VacA zur Kolonisierungseffizienz im Maus-Modell beiträgt, wobei eine Nullmutation die Etablierung einer Infektion beeinflusst [159]. Wird jedoch eine Infektion etabliert, so ist der bakterielle Titer und der Grad der Inflammatorischen Antwort solcher Stämme ähnlich wie bei dem entsprechenden Wildtyp-Stamm [159]. Weiterhin existieren einige klinische *H. pylori* Isolate, welche das VacA-Protein nicht exprimieren und den menschlichen Magen dennoch

kolonisieren können [160]. LuxS katalysiert die Synthese von AI-2, welcher die Chemotaxis negativ beeinflusst [80]. Weiterhin bilden LuxS<sup>-</sup> *H. pylori*-Stämme einen homogeneren Biofilm mit einem höheren prozentualen Anteil an adhärenen Zellen aus als der entsprechende Wildtyp [81]. Darüber hinaus zeigen LuxS<sup>-</sup> *H. pylori*-Stämme keinen signifikanten Kolonisierungsdefekt bei Mausinfektionsversuchen [82, 83]. Daher wurde vermutet, dass die Deletion des *luxS*-Locus keinen Einfluss auf die Kolonisierungseffizienz zeigen würde. In dieser Arbeit wies der Trojaner im Vergleich zum Wildtyp eine vergleichbare Kolonisierungseffizienz auf (3.3.6). Im Gegensatz zu dem nahe verwandten Bakterium *Campylobacter jejunii*, bei dem die Mutagenese von *luxS* zu einer reduzierten Kolonisierungseffizienz *in vivo* führt [161], wird aktuell davon ausgegangen, dass LuxS weniger an der Kolonisierung beteiligt ist, sondern vielmehr an der Modulation der Immunreaktion [82]. Im Hinblick auf IceA2 kann eine Einordnung der Ergebnisse zur Literatur nicht vorgenommen werden, da die Funktion von IceA2 aktuell unbekannt ist. In dieser Arbeit sollte beurteilt werden, welcher Einfluss die Gesamtheit der Deletionen im Genom des Trojaners auf die Kolonisierungseffizienz und Immunantwort hat. Möchte man den Einfluss eines einzelnen Locus auf die Kolonisierungseffizienz und Immunantwort ermitteln, so müssten entsprechende isogene *Single-Gene* Knockout-Stämme für diese Versuchsansätze verwendet werden. Diese wurden auch im Rahmen dieser Arbeit erzeugt (Daten nicht gezeigt), wurden aber aus Ressourcen- und Zeitgründen nicht individuell im mukogenen Magenschleimhautmodell untersucht.

*H. pylori* induziert bei Infektionen die Sekretion einer großen Bandbreite an Zytokinen wie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . IL-6 und TNF- $\alpha$  gelten als wichtige Marker einer Infektion, da *H. pylori*-Infektionen und Magenkrebs mit erhöhten Titern beider Marker assoziiert ist [162]. Der IL-8-Titer bei *H. pylori* infizierten Patienten mit aktiver Gastritis ist signifikant erhöht [163] und zeigt bei Infektionen von Magenschleimhautepithelzellen die stärkste Hochregulierung [164]. Die Versuche dieser Arbeit bestätigten, dass das Zytokin IL-8 von allen Zytokinen die höchste Konzentration aufweist (Abbildung 22). Alle anderen gemessenen Zytokine zeigten jedoch keinen deutlichen Anstieg gegenüber IL-8 (Abbildung 22). Wen *et al.* zeigten, dass die Bildung von AI-2 die bakterielle Adhäsion inhibiert und die IL-8-Produktion attenuiert [153]. Daher wäre zu erwarten, dass der Trojaner gegenüber dem Wildtyp bei *in vitro* Infektionsversuchen einen höheren IL-8-Titer auslösen und möglicherweise eine verbesserte Kolonisierungseffizienz zeigen würde. Der für die Infektionsversuche verwendete Trojaner *H. pylori* HP4 zeigte keinen höheren IL-8-Titer und eine gleiche Kolonisierungseffizienz relativ zum Wildtyp (3.3.6, 3.3.7). Abweichungen eigener Ergebnisse zu den von Wen *et al.*

lassen sich vermutlich darauf zurückführen, dass in den eigenen Arbeiten der mehrfach Knockout-Stamm HP4 und eine andere humane Zelllinie für die Infektionsversuche verwendet wurde. Anhand der publizierten Daten von Boccellato *et al.*, auf welchen das hier verwendete Magenmodell beruht, wurde gezeigt, dass die mRNA-Level von TNF- $\alpha$  und IL-8 innerhalb von zwei Wochen lediglich leicht anstiegen und erst nach vier Wochen ein deutlicher Unterschied zur nicht infizierten Kontrolle sichtbar wurde [165]. Im Rahmen der eigenen Arbeiten wurde ebenfalls ein niedriger Titer für beide Zytokine beobachtet, wobei die Infektionszeit bei 24 bzw. 72 h lag. Um einen deutlichen Unterschied im Zytokin-Titer zwischen den Ansätzen mit dem Trojaner, Wildtyp und der Kontrolle zu sehen, müsste vermutlich eine Infektionszeit von vier Wochen gewählt werden. Dies ließ sich im Rahmen dieser Arbeit nicht realisieren. Vergleichsdaten für die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN- $\gamma$  für dieses Magenmodell wurden nicht in der Literatur gefunden.

Insgesamt zeigte der Trojaner im Rahmen von Infektionsversuchen gegenüber dem Wildtyp eine gleiche Kolonisierungseffizienz. Dies ist für die angedachte Anwendungsstrategie von Vorteil, da der Trojaner trotz genomischer Deletionen den Magen möglichst effizient kolonisieren soll. Da der Zytokin-Titer des Trojaners ähnlich zu dem vom Wildtyp ausfiel, ist zu vermuten, dass der Stamm noch nicht ausreichend attenuiert war. Daher sollten weitere Pathogenitätsfaktoren deletiert werden, um sicherzustellen, dass der Trojaner möglichst geringfügig pathogen ist und somit von ihm später keine erhöhte Gefahr für den Patienten ausgeht. Mögliche Optimierungen des Trojaners werden im nachfolgenden Kapitel 4.3.3 näher erläutert. Weiterhin sollten die Infektionsversuche mit einer längeren Infektionszeit von vier Wochen wiederholt werden, um einen deutlichen Unterschied im Zytokin-Titer zu beobachten.

### 4.3.3 Optimierung des Trojaners

Da erste Infektionsversuche zeigten, dass die Immunogenität bzw. die quantifizierte Zytokin-Titer des Trojaners HP4 im Vergleich zum Wildtyp ähnlich ausfielen (3.3.7), sollte die Pathogenität des Stamms weiter reduziert und der Trojaner im Hinblick auf einen späteren Einsatz optimiert werden. Daher wurde nachfolgend der *cagA*-Locus deletiert, welcher für den Hauptpathogenitätsfaktor CagA codiert. Anhand eines Western-Blots wurde bestätigt, dass das ~140 kDa große CagA-Protein im Gegensatz zum Wildtyp, von dem Trojaner nicht mehr gebildet wird (3.3.8). Ein ähnlicher Western-Blot-basierter Ansatz bestätigte, dass bei Infektionsversuchen mit einem isogenen Knockout-Stamm CagA ebenfalls nicht detektiert werden konnte [166]. Im Western-Blot wurden mehrere schwache Banden in den Proben des Wildtyp- und Knockout-Stamms HP5 identifiziert (3.3.8). Hierbei zeigte sich in der Lysat-

Probe des *cagA* Knockout-Stamms HP5 eine Bande bei ~115 kDa, welche jedoch nicht in der Probe des Wildtyp-Lysats vorlag (3.3.8). Ein verkürztes CagA-Protein, welches durch die Genom-Editierung entstanden sein könnte, kann jedoch ausgeschlossen werden, da mittels Sequenzierung die vollständige Deletion des ~3,7 kbp *cagA*-Locus zusätzlich bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurde kein zweiter *cagA*-Locus im Genom gefunden, welcher für ein verkürztes CagA codieren könnte. Der Nachweis von CagA aus dem Lysat des gleichen *H. pylori* Wildtyp-Stamms sowie aus dem Lysat weiterer Stämme mittels Western-Blot unter Verwendung des gleichen CagA-Antikörpers zeigte ebenfalls eine schwache Bande oberhalb von 100 kDa [167]. In dieser Arbeit wurde ein leporiner polyklonaler CagA-Antikörper verwendet. Polyklonale Antikörper können Kreuzreaktivität zeigen und weitere Antigene binden. Da CagA nicht in der Lysat-Probe des Trojaners vorliegt, kann der CagA-Antikörper nicht mehr spezifisch an dieses Protein binden. Dies führt zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit unspezifischer Bindungen des Antikörpers an andere Proteine im Lysat, wodurch unspezifische Banden im Western-Blot deutlicher sichtbar werden als in der Wildtyp-Probe. Die schwachen Banden im Western-Blot lassen sich somit sehr wahrscheinlich auf unspezifische Bindungen des polyklonalen CagA-Antikörpers zurückführen.

Der aktuelle Stamm *H. pylori* HP5 wurde bisher noch nicht für Infektionsversuche eingesetzt. Da CagA eher die Signaltransduktion für Prozesse wie der Zellpolarität, Adhäsion, Proliferation und Anti-Apoptose beeinflusst, ist ein Einfluss auf die Kolonisierungseffizienz unwahrscheinlich [168, 169]. Ein Einfluss auf die Immunantwort würde vermutlich dann sichtbar, wenn die gesamte *cagPAI* deletiert würde (1.2.4), da diese neben CagA für das T4SS codiert, welches eine starke pro-inflammatorische Immunantwort auslöst [48]. Weiterhin würde vermutlich die Immunantwort durch eine Deletion der *cagPAI* ebenfalls reduziert werden, da neben CagA unter anderem auch ADP-Heptose durch das T4SS transloziert wird, welches den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B Signalweg stark aktiviert, wodurch letztendlich eine pro-inflammatorische Antwort ausgelöst wird [41]. Eigene Versuche die ~40 kbp große *cagPAI* zu deletieren blieben mehrfach erfolglos (Daten nicht gezeigt), obwohl sich die Herangehensweise nicht von der Erzeugung des *cagPAI* Knockout-Stamms *H. pylori* P12 $\Delta$ PAI unterschied [170]. Alternativ wäre es auch möglich die Deletion in mehreren kleineren Schritten sequenziell durchzuführen oder mittels der in dieser Arbeit erzeugten Plasmide entsprechende Deletionen im Genom des Stamms *H. pylori* P12 $\Delta$ PAI zu erzeugen. Aufgrund des hohen Zeit- und Ressourcen-Aufwandes sollten weitere Infektionsversuche erst dann umgesetzt werden, wenn die Deletion der *cagPAI* erfolgreich gelungen ist.

Insgesamt ist die Optimierung des Trojaners im Hinblick auf die Pathogenität nicht trivial, da die Deletion von Pathogenitätsfaktoren dazu führen kann, dass wichtige metabolische Prozesse und Funktionen wie zum Beispiel die Adhäsion beeinflusst werden. So war es lange Zeit nicht möglich das Gen zu deletieren, welches für die essenzielle Serinprotease HtrA codiert [171, 172]. HtrA ermöglicht *H. pylori* das Magenepithel zu zerstören, durch das Epithel zu transmigrieren und das Onkogen CagA zu injizieren. Durch das Screenen von 100 *H. pylori* Isolaten konnte bisher nur ein Stamm identifiziert werden, dessen HtrA sich deletieren und mutieren lässt, wodurch eine proteolytisch inaktive HtrA entstand [173]. Weitere Knockout-Stämme wurden in der Literatur nicht beschrieben. Weiterhin sind einige Adhäsine an der Adhärenz und gleichzeitig an inflammatorischen Prozessen beteiligt, so dass eine Deletion zwar zu einem reduzierten proinflammatorischen Zytokin-Titer, aber auch zu einer reduzierten Adhärenz führen kann [26, 29-34]. Daher muss der Einfluss jeder Deletion im Hinblick auf die Kolonisierungseffizienz und Immunantwort individuell getestet und bewertet werden. Um Veränderungen im Trojaner-Genom durch horizontalen Gentransfer während einer Anwendung im Menschen zu reduzieren, stellt der Knockout des T4SS eine weitere vielversprechende Strategie im Hinblick auf die Entwicklung eines unter Praxisbedingungen einsatzfähigen Trojaners dar. Das T4SS ist unter anderem für die Aufnahme von fremder DNA verantwortlich. Die Entfernung entsprechender Gene des *comB*-Operon führen zum vollständigen Verlust der natürlichen Kompetenz [174, 175].

Zusammenfassend sollten zukünftig die erwähnten Optimierungsvorschläge zur Reduktion der Pathogenität des Trojaners zuerst umgesetzt werden bevor weitere Infektionsversuche durchgeführt werden. Sollte sich zudem bestätigen, dass der optimierte Trojaner *in vitro* eine signifikant reduzierten Zytokin-Titer auslöst und gleichzeitig noch in der Lage ist humane Magenschleimhautepithelzellen zu kolonisieren, sollte die verbleibende Pathogenität und die Kolonisierungseffizienz im Mausmodell näher untersucht werden.

### 5 Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Dissertation wurde erstmalig die Wirksamkeit von 13 AMPs gegenüber *H. pylori* unter standardisierten Versuchsbedingungen verglichen und Untersuchungen zur zytotoxischen und hämolytischen Aktivität sowie Pepsin-Stabilität durchgeführt. Die Peptide LL-37 und Nisin A wurden als die zwei effizientesten von den hier getesteten AMPs in Bezug auf die antimikrobielle Wirkung gegenüber *H. pylori* DSM 21031 identifiziert. Da ein therapeutisch genutzter Trojaner perspektivisch eine gewisse Peptidkonzentration exprimieren muss, um eine vollständige Eradizierung des Pathogen zu erzielen, sind effizientere AMPs weiterhin von Interesse. Die Kultivierung von *H. pylori* mit einem dieser AMPs bei einer höheren mikromolaren Konzentration führte zu einer vollständigen Eradizierung. Um zukünftig effizientere AMPs zu identifizieren, könnte die Wirksamkeit gegen *H. pylori* unter Verwendung von LL-37 und Nisin A als Benchmark im Zusammenhang mit den hier verwendeten Assays, untersucht werden. Für die beiden genannten AMPs existiert eine Vielzahl an Peptidderivaten [104, 176-178], die bisher noch nicht an *H. pylori* getestet wurden. Diese könnten sehr wahrscheinlich aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu LL-37 und Nisin A ebenfalls, und möglicherweise sogar eine effizientere antimikrobielle Wirkung gegenüber *H. pylori* aufweisen. Außerdem gibt es neben Nisin A weitere natürliche Formen des Nisins [179-186], die sich durch die Anzahl und die Art der Aminosäuren an spezifischen Positionen im Molekül unterscheiden [187] und ebenfalls noch nicht an *H. pylori* getestet wurden. Im Rahmen von aktuellen *H. pylori*-Therapien werden oftmals zwei bis drei Antibiotika eingesetzt. Aktuelle Studien berichten von teils hohen Resistenzen gegenüber therapielevanten Antibiotika [88, 89], weshalb eine Therapie ausschließlich auf Basis von Antibiotika nicht zukunftsorientiert ist. Als Alternative zur einer Antibiotika-Therapie wäre ein kombinierter Ansatz aus Nisin A und LL-37 ebenfalls denkbar. Da Peptide synergistische Effekte mit Antibiotika zeigen können, wäre auch eine Ergänzung der bereits bestehenden *H. pylori*-Therapien durch LL-37 und/oder Nisin A möglich. Eine Vielzahl von kombinierten Strategien unter Verwendung von LL-37 mit unterschiedlichen Antibiotika ist bereits beschrieben [104] und könnte die Wirksamkeit therapierelevanter Antibiotika verlängern, indem dieses AMP die Durchlässigkeit der bakteriellen Membran erhöht und so das Eindringen des Antibiotikums erleichtert. Die orale Applikation von AMPs führt mit Ausnahme einiger weniger Peptide sehr wahrscheinlich dazu, dass diese enzymatisch im Magen hydrolysiert werden bevor diese ihre Wirkung gegenüber *H. pylori* entfalten können. In dieser Arbeit wurde die Sensitivität von LL-37 und Nisin A gegenüber Pepsin bestätigt. Um eine Alternative zu den bisherigen Antibiotika-Therapien zu schaffen und den Wirkstoff geschützt zum Ort der Infektion zu bringen, sollte ein attenuierter

trojanischer *H. pylori* entwickelt werden, welcher den Wirkstoff in unmittelbarer Nähe zum Pathogen bildet und freisetzt. Erste Ergebnisse eines *in vitro* Infektionsversuchs deuten darauf hin, dass die Kolonisierungseffizienz des Trojaners sich nicht vom Wildtyp-Stamm unterscheidet, weshalb dieser Stamm vermutlich trotz der genomischen Deletionen den menschlichen Magen kolonisieren kann. Allerdings zeigten die Ergebnisse dieses Versuchs auch, dass sich der durch die Infektion mit dem Trojaner induzierte Zytokin-Titer nicht vom dem nach Infektion mit dem Wildtyp-Stamm beobachteten Werten unterscheidet. Daher muss davon ausgegangen werden, dass der Trojaner trotz der gezielten Deletionen noch nicht ausreichend attenuiert wurde. Entsprechend müsste zukünftig weitere Pathogenitätsfaktoren aus dem Stamm deletiert werden (4.3.3), um einen apathogenen Stamm zu erzeugen. Aufgrund der toxischen Wirkung der AMPs darf die AMP-Synthese durch den Trojaner erst nach der Kolonisierung von Schleimhautarealen erfolgen, in denen sich pathogene *H. pylori* aufhalten. In einem ersten Schritt sollte dazu, als *Proof-of-Concept*, eine AI-2-regulierbare Reporter-kassette in das Trojaner-Genom integriert werden. Dies konnte aus Zeitgründen nicht realisiert werden. Um zukünftig den Trojaner vor der toxischen Wirkung des AMPs während dessen Expression zu schützen, sollte eine Strategie entwickelt werden, welche die Expression einer inaktiven AMP-Variante und deren spätere Aktivierung ermöglicht. Hierzu könnte ein Fusionsprotein an das AMP gekoppelt werden, welches das Peptid maskiert und sterisch dessen Aktivität abschirmt. Nach der Sekretion könnte das Fusionsprotein durch z.B. Pepsin abgespalten werden, um so das AMP in seine aktive Form zu überführen. Abschließend erscheint die Expression eines vorzeitig inaktiven AMPs durch die Kopplung an einen Fusionspartner unter der Kontrolle eines AI-2-regulierbaren Promotors als vielversprechende Kombinationsstrategie für zukünftige Arbeiten. Sollte in Zukunft die Problematik der vorliegenden Pathogenität des Trojaners gelöst werden und eine Expression eines AMPs mit der erwähnten Strategie möglich sein, kann das Konstrukt des Trojaners auch langfristig in klinischen Studien getestet werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Goodwin, C. S.; Armstrong, J. A. (1990): Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). In: *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 9 (1), S. 1–13.
- [2] Marshall, B.; Warren, J. (1984): Unidentified curved Bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. In: *The Lancet* 323 (8390), S. 1311–1315.
- [3] Hooi, J. K.; Lai, W. Y.; Ng, W. K.; Suen, M. M.; Underwood, F. E.; Tanyingoh, D. et al. (2017): Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis. In: *Gastroenterology* 153 (2), S. 420–429.
- [4] Kayali, S.; Manfredi, M.; Gaiani, F.; Bianchi, L.; Bizzarri, B.; Leandro, G. et al. (2018): *Helicobacter pylori*, transmission routes and recurrence of infection: state of the art. In: *Acta bio-medica: Atenei Parmensis* 89 (8-S), S. 72–76.
- [5] Kusters, J. G.; van Vliet, A. H.; Kuipers, E. J. (2006): Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. In: *Clinical microbiology reviews* 19 (3), S. 449–490.
- [6] Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. (2021): Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 71 (3), S. 209–249.
- [7] Huang, J. Y.; Sweeney, E. G.; Sigal, M.; Zhang, H. C.; Remington, S. J.; Cantrell, M. A. et al. (2015): Chemodetection and Destruction of Host Urea Allows *Helicobacter pylori* to Locate the Epithelium. In: *Cell host & microbe* 18 (2), S. 147–156.
- [8] Scott, D. R.; Weeks, D.; Hong, C.; Postius, S.; Melchers, K.; Sachs, G. (1998): The role of internal urease in acid resistance of *Helicobacter pylori*. In: *Gastroenterology* 114 (1), S. 58–70.
- [9] Segal, E. D.; Cha, J.; Lo, J.; Falkow, S.; Tompkins, L. S. (1999): Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (25), S. 14559–14564.
- [10] Eskandari-Nasab, E.; Sepanjnia, A.; Moghadampour, M.; Hadadi-Fishani, M.; Rezaeifar, A.; Asadi-Saghandi, A. et al. (2013): Circulating levels of interleukin (IL)-12 and IL-13 in *Helicobacter pylori*-infected patients, and their associations with bacterial CagA and VacA virulence factors. In: *Scandinavian journal of infectious diseases* 45 (5), S. 342–349.
- [11] Ferreira, R. M.; Pinto-Ribeiro, I.; Wen, X.; Marcos-Pinto, R.; Dinis-Ribeiro, M.; Carneiro, F.; Figueiredo, C. (2016): *Helicobacter pylori* cagA promoter region sequences influence CagA expression and interleukin 8 secretion. In: *The Journal of infectious diseases* 213 (4), S. 669–673.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Meyer-Rosberg, K.; Scott, D. R.; Rex, D.; Melchers, K.; Sachs, G. (1996): The effect of environmental pH on the proton motive force of *Helicobacter pylori*. In: *Gastroenterology* 111 (4), S. 886–900.
- [15] Tsuda, M.; Karita, M.; Morshed, M. G.; Okita, K.; Nakazawa, T. (1994): A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. In: *Infection and Immunity* 62 (8), S. 3586–3589.
- [16] Nolan, K. J.; McGee, D. J.; Mitchell, H. M.; Kolesnikow, T.; Harro, J. M.; O'Rourke, J. et al. (2002): In vivo behavior of a *Helicobacter pylori* SS1 nixA mutant with reduced urease activity. In: *Infection and Immunity* 70 (2), S. 685–691.

- [17] Debowski, A. W.; Walton, S. M.; Chua, E.-G.; Tay, A. C.-Y.; Liao, T.; Lamichhane, B. *et al.* (2017): *Helicobacter pylori* gene silencing in vivo demonstrates urease is essential for chronic infection. In: *PLoS pathogens* 13 (6), e1006464.
- [18] Bauerfeind, P.; Garner, R.; Dunn, B. E.; Mobley, H. L. (1997): Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. In: *Gut* 40 (1), S. 25–30.
- [19] Harris, P. R.; Mobley, H. L.; Perez-Perez, G. I.; Blaser, M. J.; Smith, P. D. (1996): *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. In: *Gastroenterology* 111 (2), S. 419–425.
- [20] Geis, G.; Suerbaum, S.; Forsthoff, B.; Leying, H.; Opferkuch, W. (1993): Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. In: *Journal of medical microbiology* 38 (5), S. 371–377.
- [21] Suerbaum, S. (1995): The complex flagella of gastric *Helicobacter* species. In: *Trends in microbiology* 3 (5), 168-70; discussion 170-1.
- [22] Nakamura, H.; Yoshiyama, H.; Takeuchi, H.; Mizote, T.; Okita, K.; Nakazawa, T. (1998): Urease plays an important role in the chemotactic motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. In: *Infection and Immunity* 66 (10), S. 4832–4837.
- [23] Ottemann, K. M.; Lowenthal, A. C. (2002): *Helicobacter pylori* uses motility for initial colonization and to attain robust infection. In: *Infection and Immunity* 70 (4), S. 1984–1990.
- [24] Hathroubi, S.; Zerebinski, J.; Ottemann, K. M. (2018): *Helicobacter pylori* Biofilm Involves a Multigene Stress-Biased Response, Including a Structural Role for Flagella. In: *mBio* 9 (5).
- [25] Yamaoka, Y.; Kikuchi, S.; el-Zimaity, H. M.; Gutierrez, O.; Osato, M. S.; Graham, D. Y. (2002): Importance of *Helicobacter pylori* oipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. In: *Gastroenterology* 123 (2), S. 414–424.
- [26] Sugimoto, M.; Ohno, T.; Graham, D. Y.; Yamaoka, Y. (2011): *Helicobacter pylori* outer membrane proteins on gastric mucosal interleukin 6 and 11 expression in Mongolian gerbils. In: *Journal of gastroenterology and hepatology* 26 (11), S. 1677–1684.
- [27] Sugimoto, M.; Ohno, T.; Graham, D. Y.; Yamaoka, Y. (2009): Gastric mucosal interleukin-17 and -18 mRNA expression in *Helicobacter pylori*-induced Mongolian gerbils. In: *Cancer science* 100 (11), S. 2152–2159.
- [28] Sallas, M. L.; Dos Santos, M. P.; Orcini, W. A.; David, É. B.; Peruquetti, R. L.; Payão, S. L.; Rasmussen, L. T. (2019): Status (on/off) of oipA gene: their associations with gastritis and gastric cancer and geographic origins. In: *Archives of microbiology* 201 (1), S. 93–97.
- [29] Odenbreit, S.; Faller, G.; Haas, R. (2002): Role of the alpAB proteins and lipopolysaccharide in adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. In: *International journal of medical microbiology : IJMM* 292 (3-4), S. 247–256.
- [30] Yamaoka, Y.; Kita, M.; Kodama, T.; Imamura, S.; Ohno, T.; Sawai, N. *et al.* (2002): *Helicobacter pylori* infection in mice: Role of outer membrane proteins in colonization and inflammation. In: *Gastroenterology* 123 (6), S. 1992–2004.
- [31] Yamaoka, Y.; Kwon, D. H.; Graham, D. Y. (2000): A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (13), S. 7533–7538.
- [32] Yamaoka, Y.; Ojo, O.; Fujimoto, S.; Odenbreit, S.; Haas, R.; Gutierrez, O. *et al.* (2006): *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. In: *Gut* 55 (6), S. 775–781.
- [33] Belogolova, E.; Bauer, B.; Pompaiah, M.; Asakura, H.; Brinkman, V.; Ertl, C. *et al.* (2013): *Helicobacter pylori* outer membrane protein HopQ identified as a novel T4SS-associated virulence factor. In: *Cellular microbiology* 15 (11), S. 1896–1912.
- [34] Zhao, Q.; Yin, W.; Zhao, R.; Wang, Y.; Song, C.; Wang, H. *et al.* (2020): Outer inflammatory protein of *Helicobacter pylori* impacts IL-8 expression, adherence, cell apoptosis and cell cycle of gastric cells independent of its copy number. In: *Medical microbiology and immunology* 209 (5), S. 621–630.

- [35] Al-Maleki, A. R.; Loke, M. F.; Lui, S. Y.; Ramli, N. S.; Khosravi, Y.; Ng, C. G. *et al.* (2017): *Helicobacter pylori* outer inflammatory protein A (OipA) suppresses apoptosis of AGS gastric cells in vitro. In: *Cellular microbiology* 19 (12).
- [36] Senkovich, O. A.; Yin, J.; Ekshyyan, V.; Conant, C.; Traylor, J.; Adegboyega, P. *et al.* (2011): *Helicobacter pylori* AlpA and AlpB bind host laminin and influence gastric inflammation in gerbils. In: *Infection and Immunity* 79 (8), S. 3106–3116.
- [37] Segal, E. D.; Lange, C.; Covacci, A.; Tompkins, L. S.; Falkow, S. (1997): Induction of host signal transduction pathways by *Helicobacter pylori*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (14), S. 7595–7599.
- [38] Fischer, W.; Tegtmeyer, N.; Stingl, K.; Backert, S. (2020): Four Chromosomal Type IV Secretion Systems in *Helicobacter pylori*: Composition, Structure and Function. In: *Frontiers in microbiology* 11, S. 1592.
- [39] Frick-Cheng, A. E.; Pyburn, T. M.; Voss, B. J.; McDonald, W. H.; Ohi, M. D.; Cover, T. L. (2016): Molecular and Structural Analysis of the *Helicobacter pylori* cag Type IV Secretion System Core Complex. In: *mBio* 7 (1), e02001-15.
- [40] Tegtmeyer, N.; Wessler, S.; Necchi, V.; Rohde, M.; Harrer, A.; Rau, T. T. *et al.* (2017): *Helicobacter pylori* Employs a Unique Basolateral Type IV Secretion Mechanism for CagA Delivery. In: *Cell host & microbe* 22 (4), 552-560.e5.
- [41] Pfannkuch, L.; Hurwitz, R.; Traulsen, J.; Sigulla, J.; Poeschke, M.; Matzner, L. *et al.* (2019): ADP heptose, a novel pathogen-associated molecular pattern identified in *Helicobacter pylori*. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 33 (8), S. 9087–9099.
- [42] Varga, M. G.; Shaffer, C. L.; Sierra, J. C.; Suarez, G.; Piazzuelo, M. B.; Whitaker, M. E. *et al.* (2016): Pathogenic *Helicobacter pylori* strains translocate DNA and activate TLR9 via the cancer-associated cag type IV secretion system. In: *Oncogene* 35 (48), S. 6262–6269.
- [43] Stein, M.; Rappuoli, R.; Covacci, A. (2000): Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (3), S. 1263–1268.
- [44] Hayashi, T.; Senda, M.; Morohashi, H.; Higashi, H.; Horio, M.; Kashiba, Y. *et al.* (2012): Tertiary structure-function analysis reveals the pathogenic signaling potentiation mechanism of *Helicobacter pylori* oncogenic effector CagA. In: *Cell host & microbe* 12 (1), S. 20–33.
- [45] Stein, M.; Bagnoli, F.; Halenbeck, R.; Rappuoli, R.; Fantl, W. J.; Covacci, A. (2002): c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. In: *Molecular Microbiology* 43 (4), S. 971–980.
- [46] Mueller, D.; Tegtmeyer, N.; Brandt, S.; Yamaoka, Y.; Poire, E. de; Sgouras, D. *et al.* (2012): c-Src and c-Abl kinases control hierarchic phosphorylation and function of the CagA effector protein in Western and East Asian *Helicobacter pylori* strains. In: *The Journal of clinical investigation* 122 (4), S. 1553–1566.
- [47] Tegtmeyer, N.; Backert, S. (2011): Role of Abl and Src family kinases in actin-cytoskeletal rearrangements induced by the *Helicobacter pylori* CagA protein. In: *European journal of cell biology* 90 (11), S. 880–890.
- [48] Backert, S.; Naumann, M. (2010): What a disorder: proinflammatory signaling pathways induced by *Helicobacter pylori*. In: *Trends in microbiology* 18 (11), S. 479–486.
- [49] 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.
- [50] Rieder, G.; Merchant, J. L.; Haas, R. (2005): *Helicobacter pylori* cag-type IV secretion system facilitates corpus colonization to induce precancerous conditions in Mongolian gerbils. In: *Gastroenterology* 128 (5), S. 1229–1242.
- [51] Park, J. Y.; Forman, D.; Waskito, L. A.; Yamaoka, Y.; Crabtree, J. E. (2018): Epidemiology of *Helicobacter pylori* and CagA-Positive Infections and Global Variations in Gastric Cancer. In: *Toxins* 10 (4).
- [52] Figura, N.; Trabalzini, L.; Mini, R.; Bernardini, G.; Scaloni, A.; Talamo, F. *et al.* (2004): Inactivation of *Helicobacter pylori* cagA gene affects motility. In: *Helicobacter* 9 (3), S. 185–193.

- [53] Leunk, R. D.; Johnson, P. T.; David, B. C.; Kraft, W. G.; Morgan, D. R. (1988): Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. In: *Journal of medical microbiology* 26 (2), S. 93–99.
- [54] Schmitt, W.; Haas, R. (1994): Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. In: *Molecular Microbiology* 12 (2), S. 307–319.
- [55] Fischer, W.; Buhrdorf, R.; Gerland, E.; Haas, R. (2001): Outer membrane targeting of passenger proteins by the vacuolating cytotoxin autotransporter of *Helicobacter pylori*. In: *Infection and Immunity* 69 (11), S. 6769–6775.
- [56] Cover, T. L.; Blaser, M. J. (1992): Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. In: *Journal of Biological Chemistry* 267 (15): 10570–10575.
- [57] Ilver, D.; Barone, S.; Mercati, D.; Lupetti, P.; Telford, J. L. (2004): *Helicobacter pylori* toxin VacA is transferred to host cells via a novel contact-dependent mechanism. In: *Cellular microbiology* 6 (2), S. 167–174.
- [58] Telford, J. L.; Ghiara, P.; Dell'Orco, M.; Comanducci, M.; Burroni, D.; Bugnoli, M. *et al.* (1994): Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. In: *The Journal of experimental medicine* 179 (5), S. 1653–1658.
- [59] Pyburn, T. M.; Foegeding, N. J.; González-Rivera, C.; McDonald, N. A.; Gould, K. L.; Cover, T. L.; Ohi, M. D. (2016): Structural organization of membrane-inserted hexamers formed by *Helicobacter pylori* VacA toxin. In: *Molecular Microbiology* 102 (1), S. 22–36.
- [60] Terebiznik, M. R.; Raju, D.; Vázquez, C. L.; Torbricki, K.; Kulkarni, R.; Blanke, S. R. *et al.* (2009): Effect of *Helicobacter pylori*'s vacuolating cytotoxin on the autophagy pathway in gastric epithelial cells. In: *Autophagy* 5 (3), S. 370–379.
- [61] 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.
- [62] Molinari, M.; Salio, M.; Galli, C.; Norais, N.; Rappuoli, R.; Lanzavecchia, A.; Montecucco, C. (1998): Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. In: *The Journal of experimental medicine* 187 (1), S. 135–140.
- [63] Foegeding, N. J.; Caston, R. R.; McClain, M. S.; Ohi, M. D.; Cover, T. L. (2016): An Overview of *Helicobacter pylori* VacA Toxin Biology. In: *Toxins* 8 (6).
- [64] McClain, M. S.; Iwamoto, H.; Cao, P.; Vinion-Dubiel, A. D.; Li, Y.; Szabo, G. *et al.* (2003): Essential role of a GXXXG motif for membrane channel formation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (14), S. 12101–12108.
- [65] Peek, R. M.; Thompson, S. A.; Donahue, J. P.; Tham, K. T.; Atherton, J. C.; Blaser, M. J.; Miller, G. G. (1998): Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iceA*, that is associated with clinical outcome. In: *Proceedings of the Association of American Physicians* 110 (6): 531–544.
- [66] Xu, Q.; Morgan, R. D.; Roberts, R. J.; Xu, S. Y.; van Doorn, L. J.; Donahue, J. P. *et al.* (2002): Functional analysis of *iceA1*, a CATG-recognizing restriction endonuclease gene in *Helicobacter pylori*. In: *Nucleic acids research* 30 (17), S. 3839–3847.
- [67] 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.
- [68] Yakoob, J.; Abbas, Z.; Khan, R.; Salim, S. A.; Abrar, A.; Awan, S.; Ahmad, Z. (2015): *Helicobacter pylori*: correlation of the virulence marker *iceA* allele with clinical outcome in a high prevalence area. In: *British journal of biomedical science* 72 (2), S. 67–73.
- [69] Yamaoka, Y.; Kodama, T.; Gutierrez, O.; Kim, J. G.; Kashima, K.; Graham, D. Y. (1999): Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. In: *Journal of clinical microbiology* 37 (7), S. 2274–2279.

- [70] Ashour, A. A.; Collares, G. B.; Mendes, E. N.; Gusmão, V. R. de; Queiroz, D. M.; Magalhães, P. P. *et al.* (2001): *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian children and adults. In: *Journal of clinical microbiology* 39 (5), S. 1746–1750.
- [71] Ciftci, I. H.; Uslan, I.; Dilek, F. H.; Aşık, G.; Özgür, M. A.; Dilek, O. N. (2011): Kronik Gastrit ve Gastrik Kanserli Hastalarda *Helicobacter pylori iceA1* ve *iceA2* Genlerinin Araştırılması. In: *Mikrobiyoloji bulteni* 45 (2): 228-233.
- [72] 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.
- [73] Chiurillo, M. A.; Moran, Y.; Cañas, M.; Valderrama, E.; Alvarez, A.; Armanie, E. (2010): Combination of *Helicobacter pylori-iceA2* and proinflammatory interleukin-1 polymorphisms is associated with the severity of histological changes in Venezuelan chronic gastritis patients. In: *FEMS immunology and medical microbiology* 59 (2), S. 170–176.
- [74] Papenfort, K.; Bassler, B. L. (2016): Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. In: *Nature reviews. Microbiology* 14 (9), S. 576–588.
- [75] Bassler, B. L.; Losick, R. (2006): Bacterially speaking. In: *Cell* 125 (2), S. 237–246.
- [76] Kim, C. S.; Gatsios, A.; Cuesta, S.; Lam, Y. C.; Wei, Z.; Chen, H. *et al.* (2020): Characterization of autoinducer-3 structure and biosynthesis in *E. coli*. In: *ACS central science* 6 (2), S. 197–206.
- [77] Papenfort, K.; Silpe, J. E.; Schramma, K. R.; Cong, J.-P.; Seyedsayamdost, M. R.; Bassler, B. L. (2017): A *Vibrio cholerae* autoinducer-receptor pair that controls biofilm formation. In: *Nature chemical biology* 13 (5), S. 551–557.
- [78] 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.
- [79] Thiel, V.; Vilchez, R.; Sztajer, H.; Wagner-Döbler, I.; Schulz, S. (2009): Identification, quantification, and determination of the absolute configuration of the bacterial quorum-sensing signal autoinducer-2 by gas chromatography-mass spectrometry. In: *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 10 (3), S. 479–485.
- [80] Rader, B. A.; Wreden, C.; Hicks, K. G.; Sweeney, E. G.; Ottemann, K. M.; Guillemin, K. (2011): *Helicobacter pylori* perceives the quorum-sensing molecule AI-2 as a chemorepellent via the chemoreceptor TlpB. In: *Microbiology* 157 (Pt 9), S. 2445–2455.
- [81] Anderson, J. K.; Huang, J. Y.; Wreden, C.; Sweeney, E. G.; Goers, J.; Remington, S. J.; Guillemin, K. (2015): Chemorepulsion from the quorum signal autoinducer-2 promotes *Helicobacter pylori* biofilm dispersal. In: *mBio* 6 (4), e00379.
- [82] Yang, C.; Rodriguez Y Baena, A.; Manso, B. A.; Hu, S.; Lopez-Magaña, R.; Ohanyan, M.; Ottemann, K. M. (2025): *Helicobacter pylori luxS* mutants cause hyperinflammatory responses during chronic infection. In: *Microbiology spectrum* 13 (1), e0107324.
- [83] Lee, W.-K.; Ogura, K.; Loh, J. T.; Cover, T. L.; Berg, D. E. (2006): Quantitative effect of *luxS* gene inactivation on the fitness of *Helicobacter pylori*. In: *Applied and environmental microbiology* 72 (10), S. 6615–6622.
- [84] Shiotani, A.; Roy, P.; Lu, H.; Graham, D. Y. (2021): *Helicobacter pylori* diagnosis and therapy in the era of antimicrobial stewardship. In: *Therapeutic advances in gastroenterology* 14, 17562848211064080.
- [85] World Health Organization (2023): 10 global health issues to track in 2021. Online verfügbar unter <https://www.who.int/news-room/spotlight/10-global-health-issues-to-track-in-2021>, zuletzt geprüft am 11.12.2023.
- [86] O'Neill, J. (2016): Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report And Recommendations. In: *The Review on Antimicrobial Resistance*: 1.
- [87] Wüppenhorst, N.; Draeger, S.; Stüger, H. P.; Hobmaier, B.; Vorreiter, J.; Kist, M.; Glocker, E.-O. (2014): Prospective multicentre study on antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Germany. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 69 (11), S. 3127–3133.

- [88] Shao, Y.; Lin, Y.; Fang, Z.; Yan, J.; Zheng, T.; Ye, G. (2024): Analysis of *Helicobacter pylori* resistance in patients with different gastric diseases. In: *Scientific reports* 14 (1), S. 4912.
- [89] Mégraud, F.; Graham, D. Y.; Howden, C. W.; Trevino, E.; Weissfeld, A.; Hunt, B. *et al.* (2023): Rates of Antimicrobial Resistance in *Helicobacter pylori* Isolates From Clinical Trial Patients Across the US and Europe. In: *The American journal of gastroenterology* 118 (2), S. 269–275.
- [90] Murakami, K.; Sakurai, Y.; Shiino, M.; Funao, N.; Nishimura, A.; Asaka, M. (2016): Vonoprazan, a novel potassium-competitive acid blocker, as a component of first-line and second-line triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a phase III, randomised, double-blind study. In: *Gut* 65 (9), S. 1439–1446.
- [91] Cho, Y. K.; Choi, M.-G.; Choi, S. C.; Lee, K. M.; Kim, T. O.; Park, S.-H. *et al.* (2020): Randomised clinical trial: tegoprazan, a novel potassium-competitive acid blocker, or lansoprazole in the treatment of gastric ulcer. In: *Alimentary pharmacology & therapeutics* 52 (5), S. 789–797.
- [92] Graham, D. Y.; Canaan, Y.; Maher, J.; Wiener, G.; Hulten, K. G.; Kalfus, I. N. (2020): Rifabutin-Based Triple Therapy (RHB-105) for *Helicobacter pylori* Eradication: A Double-Blind, Randomized, Controlled Trial. In: *Annals of internal medicine* 172 (12), S. 795–802.
- [93] Zeng, M.; Mao, X.-H.; Li, J.-X.; Tong, W.-D.; Wang, B.; Zhang, Y.-J. *et al.* (2015): Efficacy, safety, and immunogenicity of an oral recombinant *Helicobacter pylori* vaccine in children in China: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. In: *Lancet (London, England)* 386 (10002), S. 1457–1464.
- [94] Malfertheiner, P.; Selgrad, M.; Wex, T.; Romi, B.; Borgogni, E.; Spensieri, F. *et al.* (2018): Efficacy, immunogenicity, and safety of a parenteral vaccine against *Helicobacter pylori* in healthy volunteers challenged with a Cag-positive strain: a randomised, placebo-controlled phase 1/2 study. In: *The lancet. Gastroenterology & hepatology* 3 (10), S. 698–707.
- [95] Li, S.; Zhao, W.; Xia, L.; Kong, L.; Yang, L. (2023): How Long Will It Take to Launch an Effective *Helicobacter pylori* Vaccine for Humans? In: *Infection and drug resistance* 16, S. 3787–3805.
- [96] Sutton, P.; Boag, J. M. (2019): Status of vaccine research and development for *Helicobacter pylori*. In: *Vaccine* 37 (50), S. 7295–7299.
- [97] Arnold, I. C.; Dehzad, N.; Reuter, S.; Martin, H.; Becher, B.; Taube, C.; Müller, A. (2011): *Helicobacter pylori* infection prevents allergic asthma in mouse models through the induction of regulatory T cells. In: *The Journal of clinical investigation* 121 (8), S. 3088–3093.
- [98] Zhao, Y.; Li, Y.; Hu, J.; Wang, X.; Ren, M.; Lu, G. *et al.* (2020): The effect of *Helicobacter pylori* eradication in patients with gastroesophageal reflux disease: a meta-analysis of randomized controlled studies. In: *Digestive diseases (Basel, Switzerland)* 38 (4), S. 261–268.
- [99] Zeng, J.; Xie, C.; Zhang, L.; Liu, X.; Chan, M. T.; Wu, W. K.; Chen, H. (2022): Host Cell Antimicrobial Responses against *Helicobacter pylori* Infection: From Biological Aspects to Therapeutic Strategies. In: *International journal of molecular sciences* 23 (18).
- [100] Peschel, A.; Sahl, H.-G. (2006): The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. In: *Nature reviews. Microbiology* 4 (7), S. 529–536.
- [101] Mahlapuu, M.; Håkansson, J.; Ringstad, L.; Björn, C. (2016): Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. In: *Frontiers in cellular and infection microbiology* 6, S. 194.
- [102] Vlieghe, P.; Lisowski, V.; Martinez, J.; Khrestchatsky, M. (2010): Synthetic therapeutic peptides: science and market. In: *Drug discovery today* 15 (1-2), S. 40–56.
- [103] Hase, K.; Murakami, M.; Iimura, M.; Cole, S. P.; Horibe, Y.; Ohtake, T. *et al.* (2003): Expression of LL-37 by human gastric epithelial cells as a potential host defense mechanism against *Helicobacter pylori*. In: *Gastroenterology* 125 (6), S. 1613–1625.
- [104] Ridyard, K. E.; Overhage, J. (2021): The Potential of Human Peptide LL-37 as an Antimicrobial and Anti-Biofilm Agent. In: *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 10 (6).
- [105] Edwards, P. J.; Morwood, K. (1992): Pharmaceutical compositions against gastric disorders. Veröffentlichungsnr.: WO 92/18143.

- [106] Bucki, R.; Leszczyńska, K.; Namiot, A.; Sokołowski, W. (2010): Cathelicidin LL-37: a multitask antimicrobial peptide. In: *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 58 (1), S. 15–25.
- [107] Wiedemann, I.; Breukink, E.; van Kraaij, C.; Kuipers, O. P.; Bierbaum, G.; Kruijff, B. de; Sahl, H. G. (2001): Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (3), S. 1772–1779.
- [108] Mahlapuu, M.; Sidorowicz, A.; Mikosinski, J.; Krzyżanowski, M.; Orleanski, J.; Twardowska-Sauchka, K. et al. (2021): Evaluation of LL-37 in healing of hard-to-heal venous leg ulcers: A multicentric prospective randomized placebo-controlled clinical trial. In: *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 29 (6), S. 938–950.
- [109] Cleveland, J.; Montville, T. J.; Nes, I. F.; Chikindas, M. L. (2001): Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. In: *International journal of food microbiology* 71 (1), S. 1–20.
- [110] Aliramaei, M. R.; Khorasgani, M. R.; Rahmani, M. R.; Zarkesh Esfahani, S. H.; Emamzadeh, R. (2019): Expression of *Helicobacter pylori* *cagL* gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and evaluation of its immunogenicity as an oral vaccine in mice. In: *Microbial pathogenesis* 142, S. 103926.
- [111] Le Guo; Zhang, F.; Wang, S.; Li, R.; Zhang, L.; Zhang, Z. et al. (2022): Oral immunization with a M cell-targeting recombinant *L. lactis* vaccine LL-plSAM-FVpE stimulate protective immunity against *H. pylori* in mice. In: *Frontiers in immunology* 13, S. 918160.
- [112] Cen, Q.; Gao, T.; Ren, Y.; Lu, X.; Lei, H. (2021): Immune evaluation of a *Saccharomyces cerevisiae*-based oral vaccine against *Helicobacter pylori* in mice. In: *Helicobacter* 26 (1), e12772.
- [113] Benghezal, M.; Schoep, T.; Fulurija, A.; Berg, D. E.; Marshall, B. J.: Means Of Controlling Infection Persistence Of *Helicobacter pylori*. Veröffentlichungsnr.: WO 2011/160182 A1.
- [114] Kim, S. Y.; Chung, J.-W. (2020): Best *Helicobacter pylori* Eradication Strategy in the Era of Antibiotic Resistance. In: *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 9 (8).
- [115] Younes, M.; Aggett, P.; Aguilar, F.; Crebelli, R.; Dusemund, B.; Filipič, M. et al. (2017): Safety of nisin (E 234) as a food additive in the light of new toxicological data and the proposed extension of use. In: *EFSA journal. European Food Safety Authority* 15 (12), e05063.
- [116] Xue, T.; Zhao, L.; Sun, H.; Zhou, X.; Sun, B. (2009): LsrR-binding site recognition and regulatory characteristics in *Escherichia coli* AI-2 quorum sensing. In: *Cell research* 19 (11), S. 1258–1268.
- [117] Debowski, A. W.; Gauntlett, J. C.; Li, H.; Liao, T.; Sehnal, M.; Nilsson, H.-O. et al. (2012): Xer-cise in *Helicobacter pylori*: one-step transformation for the construction of markerless gene deletions. In: *Helicobacter* 17 (6), S. 435–443.
- [118] Greco, I.; Molchanova, N.; Holmedal, E.; Jenssen, H.; Hummel, B. D.; Watts, J. L. et al. (2020): Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. In: *Scientific reports* 10 (1), S. 13206.
- [119] Throup, J. P.; Camara, M.; Briggs, G. S.; Winson, M. K.; Chhabra, S. R.; Bycroft, B. W. et al. (1995): Characterisation of the *yenI/yenR* locus from *Yersinia enterocolitica* mediating the synthesis of two N-acylhomoserine lactone signal molecules. In: *Molecular Microbiology* 17 (2), S. 345–356.
- [120] Wang, R.; Edrington, T. C.; Storrs, S. B.; Crowley, K. S.; Ward, J. M.; Lee, T. C. et al. (2017): Analyzing pepsin degradation assay conditions used for allergenicity assessments to ensure that pepsin susceptible and pepsin resistant dietary proteins are distinguishable. In: *PLoS ONE* 12 (2), e0171926.
- [121] Choyam, S.; Jain, P. M.; Kammara, R. (2021): Characterization of a potent new-generation antimicrobial peptide of *Bacillus*. In: *Frontiers in Microbiology* 12, S. 710741.
- [122] Shin, J. R.; Lim, K. J.; Da Kim, J.; Cho, J. H.; Kim, S. C. (2013): Display of multimeric antimicrobial peptides on the *Escherichia coli* cell surface and its application as whole-cell antibiotics. In: *PLoS ONE* 8 (3), e58997.
- [123] Niehues, J.; McElroy, C.; Croon, A.; Pietschmann, J.; Frettlöh, M.; Schröper, F. (2021): Bacterial lighthouses-real-time detection of *Yersinia enterocolitica* by quorum sensing. In: *Biosensors* 11 (12).

- [124] Dailidienė, D.; Dailidė, G.; Kersulytė, D.; Berg, D. E. (2006): Contraselectable streptomycin susceptibility determinant for genetic manipulation and analysis of *Helicobacter pylori*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 72 (9), S. 5908–5914.
- [125] Guzman, J.; Téné, N.; Touchard, A.; Castillo, D.; Belkhef, H.; Haddioui-Hbabi, L. *et al.* (2017): Anti-*Helicobacter pylori* properties of the ant-venom peptide bicarinalin. In: *Toxins* 10 (1), S. 21.
- [126] Narayana, J. L.; Huang, H.-N.; Wu, C.-J.; Chen, J.-Y. (2015): Efficacy of the antimicrobial peptide TP4 against *Helicobacter pylori* infection: *in vitro* membrane perturbation via micellization and *in vivo* suppression of host immune responses in a mouse model. In: *Oncotarget* 6 (15), S. 12936–12954.
- [127] Narayana, J. L.; Huang, H.-N.; Wu, C.-J.; Chen, J.-Y. (2015): Epinecidin-1 antimicrobial activity: *in vitro* membrane lysis and *in vivo* efficacy against *Helicobacter pylori* infection in a mouse model. In: *Biomaterials* 61, S. 41–51.
- [128] Olleik, H.; Baydoun, E.; Perrier, J.; Hijazi, A.; Raymond, J.; Manzoni, M. *et al.* (2019): Temporin-SHa and its analogs as potential candidates for the treatment of *Helicobacter pylori*. In: *Biomolecules* 9 (10), S. 598.
- [129] Rigano, M. M.; Romanelli, A.; Fulgione, A.; Nocerino, N.; D'Agostino, N.; Avitabile, C. *et al.* (2012): A novel synthetic peptide from a tomato defensin exhibits antibacterial activities against *Helicobacter pylori*. In: *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* 18 (12), S. 755–762.
- [130] Sistla, S. (2013): Structure-activity relationships of  $\alpha$ -casein peptides with multifunctional biological activities. In: *Molecular and cellular biochemistry* 384 (1-2), S. 29–38.
- [131] Zhang, X.; Jiang, A.; Wang, G.; Yu, H.; Qi, B.; Xiong, Y. *et al.* (2017): Fusion expression of the PGLa-AM1 with native structure and evaluation of its anti-*Helicobacter pylori* activity. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 101 (14), S. 5667–5675.
- [132] Iwahori, A.; Hirota, Y.; Sampe, R.; Miyano, S.; Takahashi, N.; Sasatsu, M. *et al.* (1997): On the antibacterial activity of normal and reversed magainin 2 analogs against *Helicobacter pylori*. In: *Biological & pharmaceutical bulletin* 20 (7), S. 805–808.
- [133] Zhang, X.-L.; Jiang, A.-M.; Ma, Z.-Y.; Li, X.-B.; Xiong, Y.-Y.; Dou, J.-F.; Wang, J.-F. (2015): The synthetic antimicrobial peptide pexiganan and its nanoparticles (PNPs) exhibit the anti-*Helicobacter pylori* activity *in vitro* and *in vivo*. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 20 (3), S. 3972–3985.
- [134] Kim, T.-S.; Hur, J.-W.; Yu, M.-A.; Cheigh, C.-I.; Kim, K.-N.; Hwang, J.-K.; Pyun, Y.-R. (2003): Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteriocins of lactic acid bacteria. In: *Journal of food protection* 66 (1), S. 3–12.
- [135] Jang, S. A.; Kim, H.; Lee, J. Y.; Shin, J. R.; Da Kim, J.; Cho, J. H.; Kim, S. C. (2012): Mechanism of action and specificity of antimicrobial peptides designed based on buforin IIb. In: *Peptides* 34 (2), S. 283–289.
- [136] Hur, S. J.; Lim, B. O.; Decker, E. A.; McClements, D. J. (2011): *in vitro* human digestion models for food applications. In: *Food Chemistry* 125 (1), S. 1–12.
- [137] Zhang, W.; Yang, Z.; Zheng, J.; Fu, K.; Wong, J. H.; Ni, Y. *et al.* (2023): A bioresponsive genetically encoded antimicrobial crystal for the oral treatment of *Helicobacter pylori* infection. In: *Advanced science (Weinheim, Baden-Württemberg, Germany)* 10 (30), e2301724.
- [138] Charest, A. M.; Reed, E.; Bozorgzadeh, S.; Hernandez, L.; Getsey, N. V.; Smith, L. *et al.* (2024): Nisin Inhibition of Gram-Negative Bacteria. In: *Microorganisms* 12 (6).
- [139] Keil, B. (1992) *Specificity of Proteolysis*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin / Heidelberg.
- [140] Strömstedt, A. A.; Pasupuleti, M.; Schmidtchen, A.; Malmsten, M. (2009): Evaluation of strategies for improving proteolytic resistance of antimicrobial peptides by using variants of EFK17, an internal segment of LL-37. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53 (2), S. 593–602.
- [141] Malmsten, M.; Kasetty, G.; Pasupuleti, M.; Alenfall, J.; Schmidtchen, A. (2011): Highly selective end-tagged antimicrobial peptides derived from PRELP. In: *PLoS ONE* 6 (1), e16400.
- [142] Ueda, K.; Shimizu, M.; Ohashi, A.; Murata, D.; Suzuki, T.; Kobayashi, N. *et al.* (2020): Albumin fusion at the N-terminus or C-terminus of human lactoferrin leads to improved pharmacokinetics and anti-

- proliferative effects on cancer cell lines. In: *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 155, S. 105551.
- [143] Rollema, H. S.; Kuipers, O. P.; Both, P.; Vos, W. M. de; Siezen, R. J. (1995): Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. In: *Applied and Environmental Microbiology* 61 (8), S. 2873–2878.
- [144] Wiegand, I.; Hilpert, K.; Hancock, R. E. (2008): Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. In: *Nature protocols* 3 (2), S. 163–175.
- [145] McLean, D. T.; McCrudden, M. T.; Linden, G. J.; Irwin, C. R.; Conlon, J. M.; Lundy, F. T. (2014): Antimicrobial and immunomodulatory properties of PGLa-AM1, CPF-AM1, and magainin-AM1: potent activity against oral pathogens. In: *Regulatory peptides* 194-195, S. 63–68.
- [146] Verbeke, F.; Craemer, S. de; Debunne, N.; Janssens, Y.; Wynendaele, E.; van de Wiele, C.; Spiegeleer, B. de (2017): Peptides as quorum sensing molecules: measurement techniques and obtained levels *in vitro* and *in vivo*. In: *Frontiers in neuroscience* 11, S. 183.
- [147] 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.
- [148] Gorelik, O.; Levy, N.; Shaulov, L.; Yegodayev, K.; Meijler, M. M.; Sal-Man, N. (2019): *Vibrio cholerae* autoinducer-1 enhances the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 4122.
- [149] Patel, N. M.; Moore, J. D.; Blackwell, H. E.; Amador-Noguez, D. (2016): Identification of Unanticipated and Novel N-Acyl L-Homoserine Lactones (AHLs) Using a Sensitive Non-Targeted LC-MS/MS Method. In: *PLoS ONE* 11 (10), e0163469.
- [150] Guo, C.-J.; Chang, F.-Y.; Wyche, T. P.; Backus, K. M.; Acker, T. M.; Funabashi, M. *et al.* (2017): Discovery of Reactive Microbiota-Derived Metabolites that Inhibit Host Proteases. In: *Cell* 168 (3), 517-526.e18.
- [151] Park, H. B.; Crawford, J. M. (2016): Pyrazinone protease inhibitor metabolites from *Photorhabdus luminescens*. In: *The Journal of antibiotics* 69 (8), S. 616–621.
- [152] Oh, J.; Patel, J.; Park, H. B.; Crawford, J. M. (2018):  $\beta$ -Lactam Biotransformations Activate Innate Immunity. In: *The Journal of organic chemistry* 83 (13), S. 7173–7179.
- [153] Wen, Y.; Huang, H.; Tang, T.; Yang, H.; Wang, X.; Huang, X. *et al.* (2021): AI-2 represses CagA expression and bacterial adhesion, attenuating the *Helicobacter pylori*-induced inflammatory response of gastric epithelial cells. In: *Helicobacter* 26 (2), e12778.
- [154] Rader, B. A.; Campagna, S. R.; Semmelhack, M. F.; Bassler, B. L.; Guillemin, K. (2007): The quorum-sensing molecule autoinducer 2 regulates motility and flagellar morphogenesis in *Helicobacter pylori*. In: *Journal of bacteriology* 189 (17), S. 6109–6117.
- [155] Doherty, N. C.; Shen, F.; Halliday, N. M.; Barrett, D. A.; Hardie, K. R.; Winzer, K.; Atherton, J. C. (2010): In *Helicobacter pylori*, LuxS is a key enzyme in cysteine provision through a reverse transsulfuration pathway. In: *Journal of bacteriology* 192 (5), S. 1184–1192.
- [156] Kuck, D.; Kolmerer, B.; Iking-Konert, C.; Krammer, P. H.; Stremmel, W.; Rudi, J. (2001): Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. In: *Infection and Immunity* 69 (8), S. 5080–5087.
- [157] Baj, J.; Forma, A.; Sitarz, M.; Portincasa, P.; Garruti, G.; Krasowska, D.; Maciejewski, R. (2020): *Helicobacter pylori* virulence factors-mechanisms of bacterial pathogenicity in the gastric microenvironment. In: *Cells* 10 (1).
- [158] D. Nishiya; T. Shimoyama; S. Fukuda; T. Yoshimura; M. Tanaka; A. Munakata (2000): Evaluation of the clinical relevance of the *iceA1* gene in patients with *Helicobacter pylori* infection in Japan.
- [159] Salama, N. R.; Otto, G.; Tompkins, L.; Falkow, S. (2001): Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. In: *Infection and Immunity* 69 (2), S. 730–736.

- [160] Xiang, Z.; Censini, S.; Bayeli, P. F.; Telford, J. L.; Figura, N.; Rappuoli, R.; Covacci, A. (1995): Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. In: *Infection and Immunity* 63 (1), S. 94–98.
- [161] Plummer, P.; Sahin, O.; Burrough, E.; Sippy, R.; Mou, K.; Rabenold, J. *et al.* (2012): Critical role of LuxS in the virulence of *Campylobacter jejuni* in a guinea pig model of abortion. In: *Infection and Immunity* 80 (2), S. 585–593.
- [162] Yu, B.; Xiang, L.; Peppelenbosch, M. P.; Fuhler, G. M. (2023): Overlapping cytokines in *H. pylori* infection and gastric cancer: A tandem meta-analysis. In: *Frontiers in immunology* 14, S. 1125658.
- [163] Crabtree, J. E.; Peichl, P.; Wyatt, J.; Stachl, U.; Lindley, I. J. (1993): Gastric interleukin-8 and IgA IL-8 autoantibodies in *Helicobacter pylori* infection. In: *Scandinavian journal of immunology* 37 (1), S. 65–70.
- [164] Eftang, L. L.; Esbensen, Y.; Tannæs, T. M.; Bukholm, I. R.; Bukholm, G. (2012): Interleukin-8 is the single most up-regulated gene in whole genome profiling of *H. pylori* exposed gastric epithelial cells. In: *BMC microbiology* 12, S. 9.
- [165] Boccellato, F.; Woelffling, S.; Imai-Matsushima, A.; Sanchez, G.; Goosmann, C.; Schmid, M. *et al.* (2019): Polarised epithelial monolayers of the gastric mucosa reveal insights into mucosal homeostasis and defence against infection. In: *Gut* 68 (3), S. 400–413.
- [166] Moese, S.; Selbach, M.; Brinkmann, V.; Karlas, A.; Haimovich, B.; Backert, S.; Meyer, T. F. (2007): The *Helicobacter pylori* CagA protein disrupts matrix adhesion of gastric epithelial cells by dephosphorylation of vinculin. In: *Cellular microbiology* 9 (5), S. 1148–1161.
- [167] Diechler, S.; Chichirau, B. E.; Posselt, G.; Sgouras, D. N.; Wessler, S. (2021): *Helicobacter pylori* CagA EPIYA Motif Variations Affect Metabolic Activity in B Cells. In: *Toxins* 13 (9).
- [168] Tegtmeyer, N.; Neddermann, M.; Asche, C. I.; Backert, S. (2017): Subversion of host kinases: a key network in cellular signaling hijacked by *Helicobacter pylori* CagA. In: *Molecular Microbiology* 105 (3), S. 358–372.
- [169] Naumann, M.; Sokolova, O.; Tegtmeyer, N.; Backert, S. (2017): *Helicobacter pylori*: A Paradigm Pathogen for Subverting Host Cell Signal Transmission. In: *Trends in microbiology* 25 (4), S. 316–328.
- [170] Odenbreit, S.; Gebert, B.; Püls, J.; Fischer, W.; Haas, R. (2001): Interaction of *Helicobacter pylori* with professional phagocytes: role of the cag pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of CagA. In: *Cellular microbiology* 3 (1), S. 21–31.
- [171] Salama, N. R.; Shepherd, B.; Falkow, S. (2004): Global transposon mutagenesis and essential gene analysis of *Helicobacter pylori*. In: *Journal of bacteriology* 186 (23), S. 7926–7935.
- [172] Hoy, B.; Löwer, M.; Weydig, C.; Carra, G.; Tegtmeyer, N.; Geppert, T. *et al.* (2010): *Helicobacter pylori* HtrA is a new secreted virulence factor that cleaves E-cadherin to disrupt intercellular adhesion. In: *EMBO reports* 11 (10), S. 798–804.
- [173] Zawilak-Pawlik, A.; Zarzecka, U.; Żyła-Uklejewicz, D.; Lach, J.; Strapagiel, D.; Tegtmeyer, N. *et al.* (2019): Establishment of serine protease htrA mutants in *Helicobacter pylori* is associated with secA mutations. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 11794.
- [174] Karnholz, A.; Hoefler, C.; Odenbreit, S.; Fischer, W.; Hofreuter, D.; Haas, R. (2006): Functional and topological characterization of novel components of the comB DNA transformation competence system in *Helicobacter pylori*. In: *Journal of bacteriology* 188 (3), S. 882–893.
- [175] Hofreuter, D.; Odenbreit, S.; Haas, R. (2001): Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. In: *Molecular Microbiology* 41 (2), S. 379–391.
- [176] Des Field; Connor, P. M.; Cotter, P. D.; Hill, C.; Ross, R. P. (2008): The generation of nisin variants with enhanced activity against specific gram-positive pathogens. In: *Molecular Microbiology* 69 (1), S. 218–230.

- [177] Des Field; Begley, M.; O'Connor, P. M.; Daly, K. M.; Hugenholtz, F.; Cotter, P. D. *et al.* (2012): Bioengineered Nisin A derivatives with enhanced activity against both Gram positive and Gram negative pathogens. In: *PLoS ONE* 7 (10), e46884.
- [178] Des Field; Blake, T.; Mathur, H.; O' Connor, P. M.; Cotter, P. D.; Paul Ross, R.; Hill, C. (2019): Bioengineering Nisin to overcome the Nisin resistance protein. In: *Molecular Microbiology* 111 (3), S. 717–731.
- [179] De Kwaadsteniet, M.; Ten Doeschate, K.; Dicks, L. M. (2008): Characterization of the structural gene encoding Nisin F, a new lantibiotic produced by a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolate from freshwater catfish (*Clarias gariepinus*). In: *Applied and Environmental Microbiology* 74 (2), S. 547–549.
- [180] O'Connor, P. M.; O'Shea, E. F.; Guinane, C. M.; O'Sullivan, O.; Cotter, P. D.; Ross, R. P.; Hill, C. (2015): Nisin H is a new Nisin variant produced by the gut-derived strain *Streptococcus hyointestinalis* DPC6484. In: *Applied and Environmental Microbiology* 81 (12), S. 3953–3960.
- [181] O'Sullivan, J. N.; O'Connor, P. M.; Rea, M. C.; O'Sullivan, O.; Walsh, C. J.; Healy, B. *et al.* (2020): Nisin J, a novel natural Nisin variant, is produced by *Staphylococcus capitis* sourced from the human skin microbiota. In: *Journal of bacteriology* 202 (3).
- [182] Hatzioanou, D.; Gherghisan-Filip, C.; Saalbach, G.; Horn, N.; Wegmann, U.; Duncan, S. H. *et al.* (2017): Discovery of a novel lantibiotic Nisin O from *Blautia obeum* A2-162, isolated from the human gastrointestinal tract. In: *Microbiology* 163 (9), S. 1292–1305.
- [183] Garcia-Gutierrez, E.; O'Connor, P. M.; Saalbach, G.; Walsh, C. J.; Hegarty, J. W.; Guinane, C. M. *et al.* (2020): First evidence of production of the lantibiotic Nisin P. In: *Scientific reports* 10 (1), S. 3738.
- [184] Zendo, T.; Fukao, M.; Ueda, K.; Higuchi, T.; Nakayama, J.; Sonomoto, K. (2003): Identification of the lantibiotic Nisin Q, a new natural Nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. In: *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 67 (7), S. 1616–1619.
- [185] Wirawan, R. E.; Klesse, N. A.; Jack, R. W.; Tagg, J. R. (2006): Molecular and genetic characterization of a novel Nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 72 (2), S. 1148–1156.
- [186] Mulders, J. W.; Boerrigter, I. J.; Rollema, H. S.; Siezen, R. J.; Vos, W. M. de (1991): Identification and characterization of the lantibiotic Nisin Z, a natural Nisin variant. In: *European journal of biochemistry* 201 (3), S. 581–584.
- [187] Da Silva Oliveira, W.; Teixeira, C. R.; Mantovani, H. C.; Dolabella, S. S.; Jain, S.; Barbosa, A. A. (2024): Nisin variants: What makes them different and unique? In: *Peptides* 177, S. 171220.

## 7 Anhang

## 7.1 BioLector Wachstumskinetiken

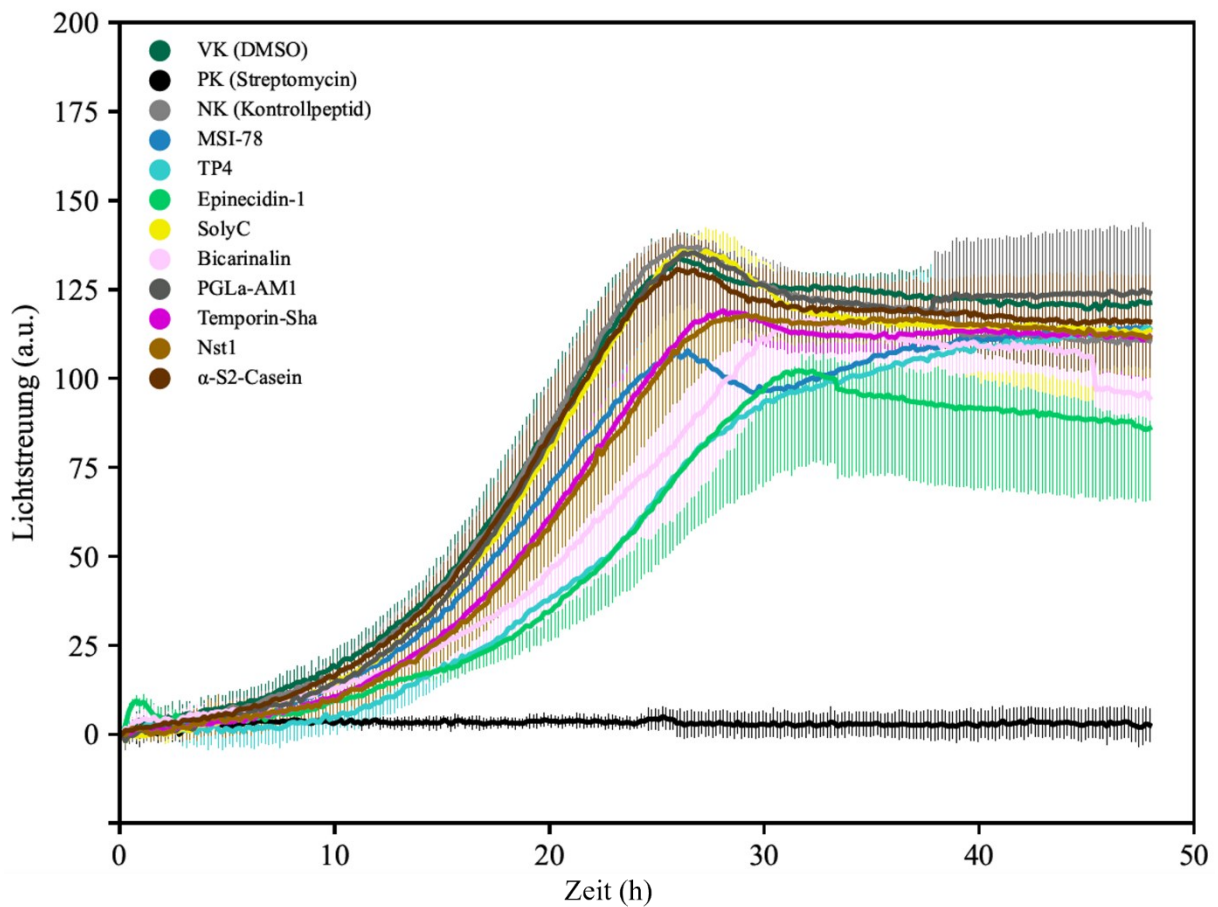


Abbildung 24: *H. pylori* Wachstumskinetiken unter Einfluss von AMPs - Teil 1 mit Standardabweichung

*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. Da alle AMPs in DMSO gelöst vorlagen, wurde eine entsprechende Vehikelkontrolle (VK) mit DMSO mitgeführt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten jeweils durchgeführt in drei technischen Replikaten ( $n = 3$ ). a.u. = *Arbitrary Unit*.

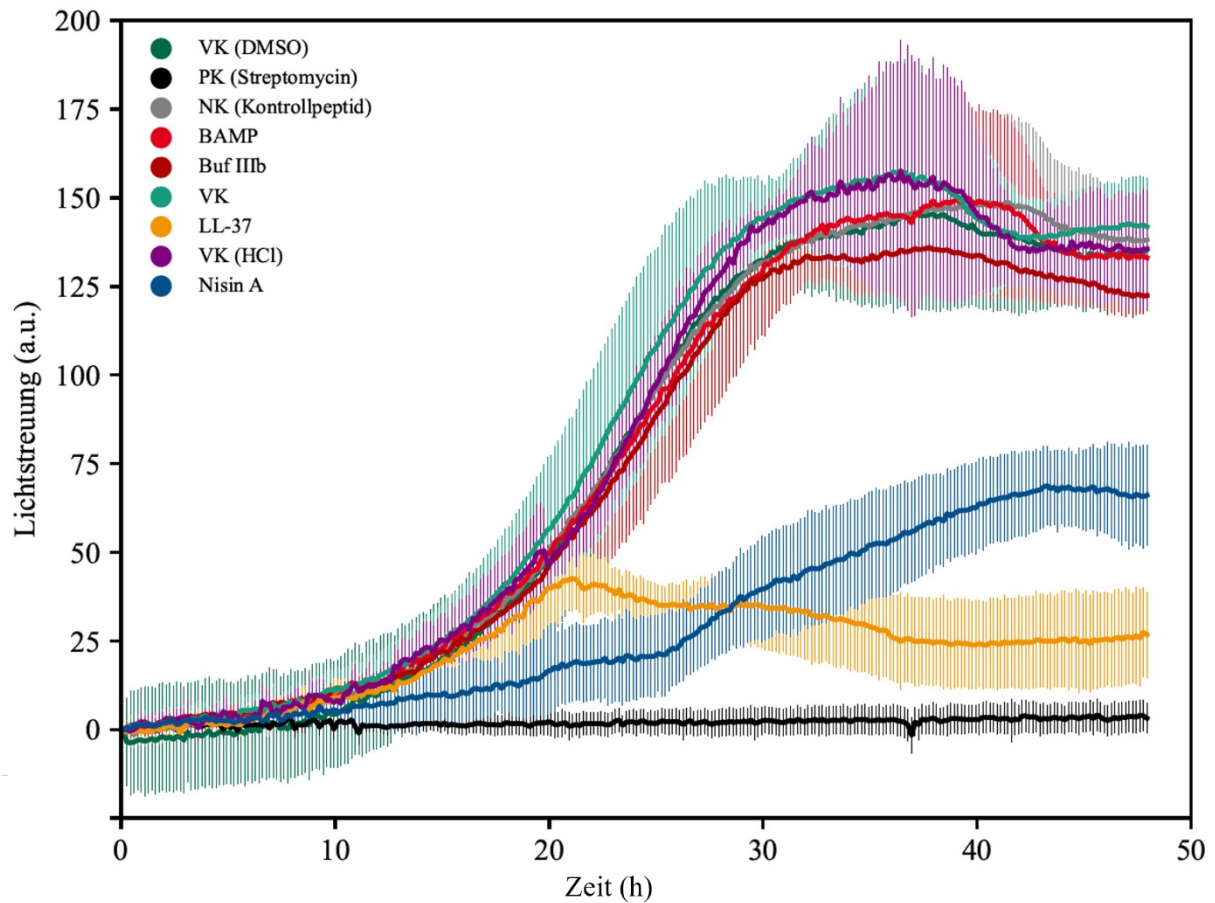
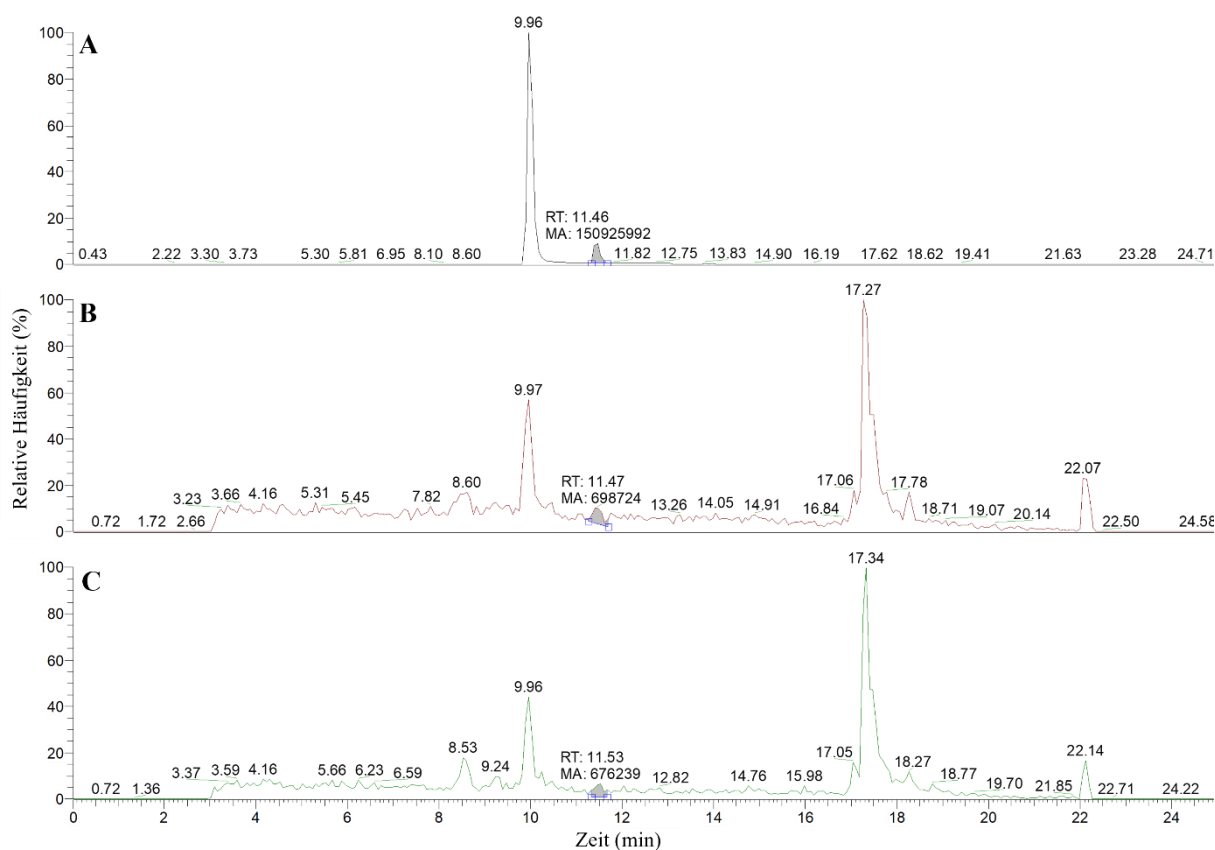


Abbildung 25: *H. pylori* Wachstumskinetiken unter Einfluss von AMPs - Teil 2 mit Standardabweichung

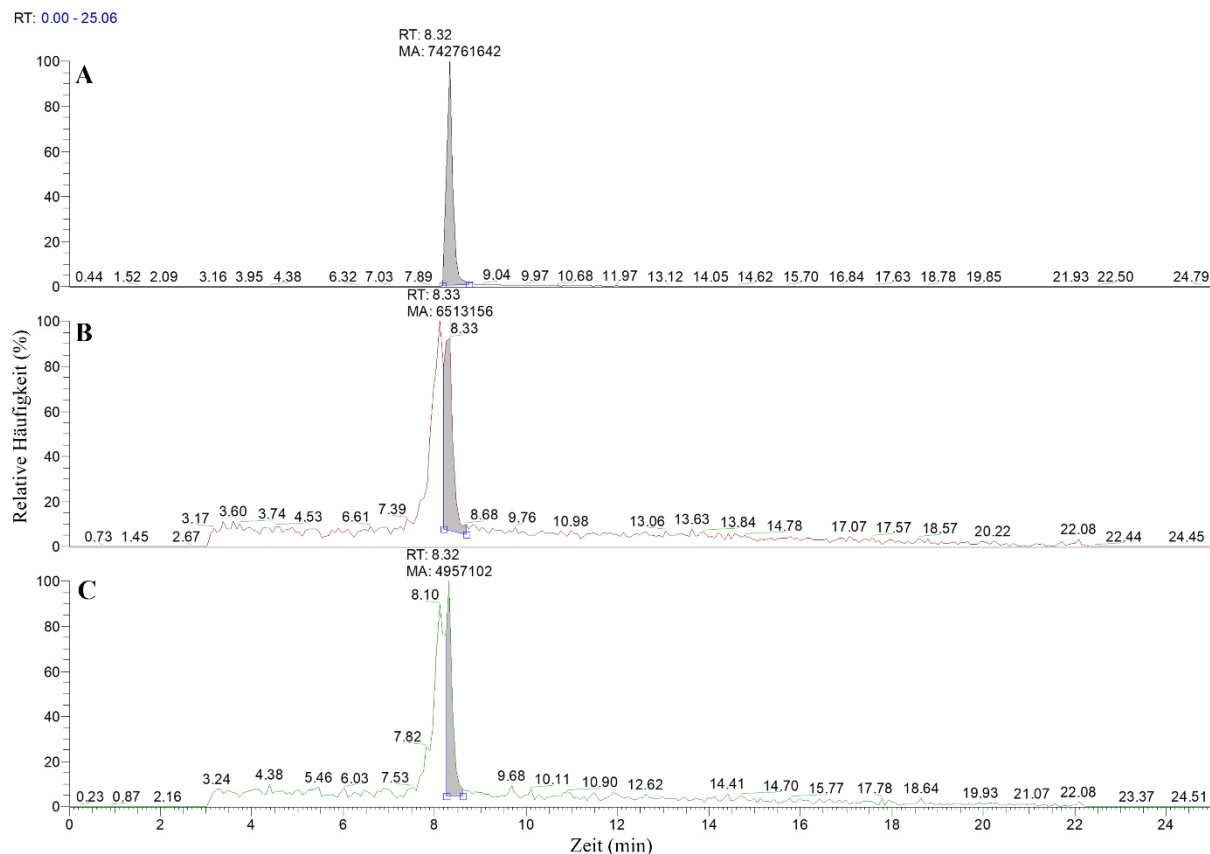
*H. pylori* DSM 21031 wurde für 48 h im BioLector<sup>®</sup> Pro System bei 800 rpm und 37°C unter mikroaerophilen Bedingungen kultiviert. Der Einfluss unterschiedlicher AMPs auf das Wachstumsverhalten wurde mittels *Light Scatter* aufgezeichnet. Das Antibiotikum Streptomycin wurde als Positivkontrolle (PK) und als Negativkontrolle (NK) wurde ein Kontrollpeptid mitgeführt. Für die Peptide BAMP und Buf IIIb wurde eine Vehikelkontrolle (VK) mit DMSO und für Nisin A 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*.

## 7.2 Weitere AI-3 Chromatogramme

RT: 0.00 - 25.06

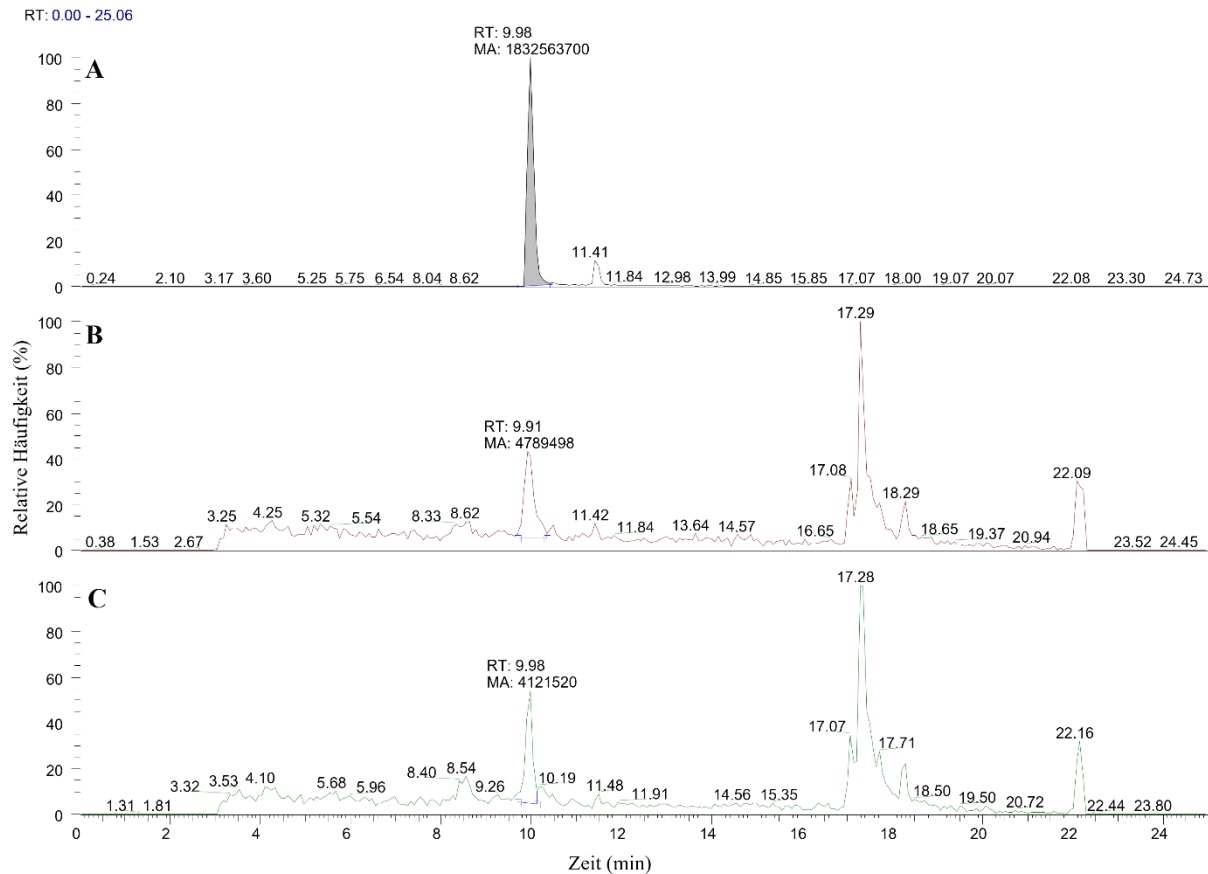
Abbildung 26: LC-MS/MS-basierter Nachweis von Pyrazinon 1 aus *H. pylori*-Kulturüberstand

Für den Nachweis des AI-3-Moleküls 5-Isopropyl-3-(2-methylsulfanylethyl)-2(1H)-pyrazinon (Pyrazinon 2) wurde das Molekül in *H. pylori*-Kulturmedium als Positivkontrolle formuliert (A). Der sterile Kulturüberstand von *H. pylori* DSM 21031 nach 24 h wurde als Probe (B) und das *H. pylori*-Kulturmedium wurde als Negativkontrolle mitgeführt (C). Die Proben wurden anschließend mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion extrahiert und die Extrakte mittels LC-MS/MS durch Alexander Croon (Fraunhofer IME) gemessen.



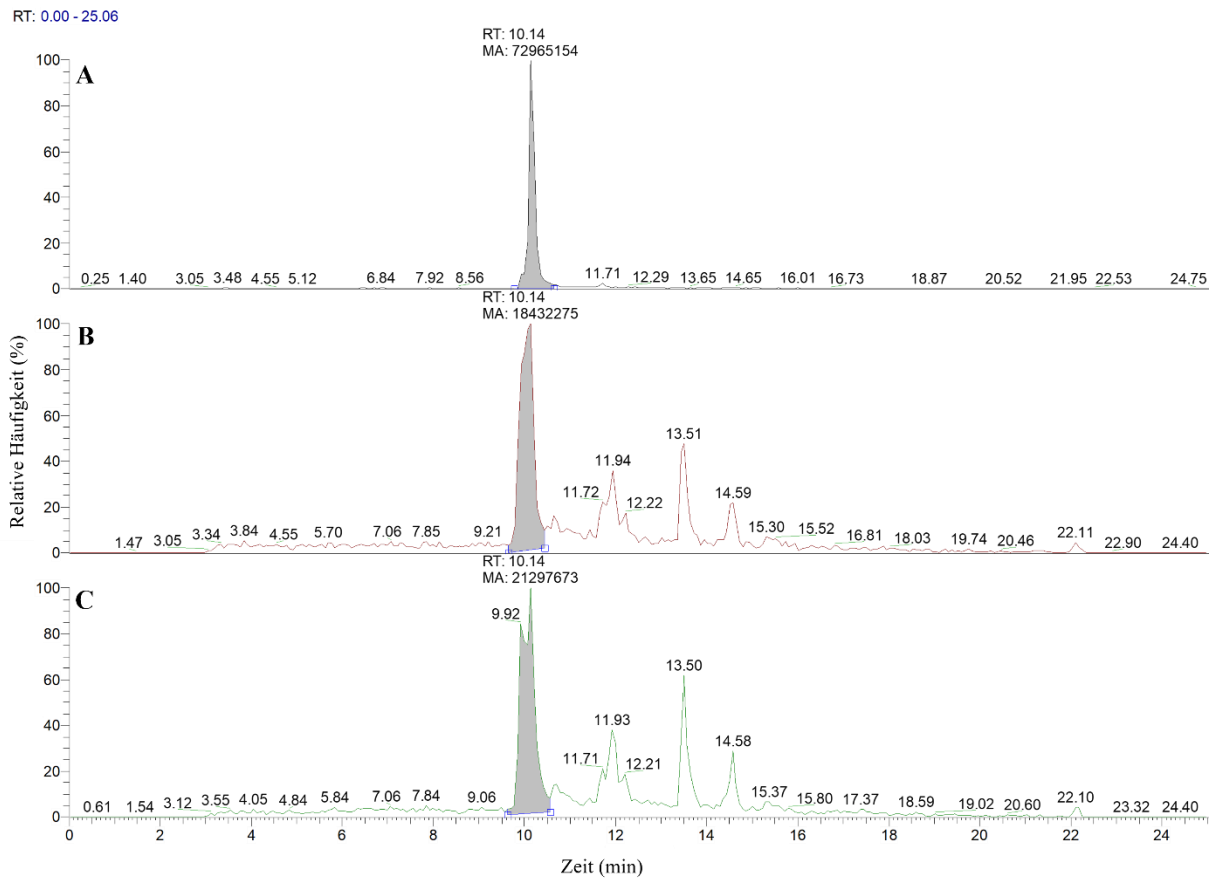
**Abbildung 27: LC-MS/MS-basierter Nachweis von Pyrazinon 2 aus *H. pylori*-Kulturüberstand**

Für den Nachweis des AI-3-Moleküls 5-Methyl-3-(2-methylsulfanylethyl)-2(1H)-pyrazinon (Pyrazinon 2) wurde das Molekül in *H. pylori*-Kulturmedium als Positivkontrolle formuliert (A). Der sterile Kulturüberstand von *H. pylori* DSM 21031 nach 24 h wurde als Probe (B) und das *H. pylori*-Kulturmedium wurde als Negativkontrolle mitgeführt (C). Die Proben wurden anschließend mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion extrahiert und die Extrakte mittels LC-MS/MS durch Alexander Croon (Fraunhofer IME) gemessen.



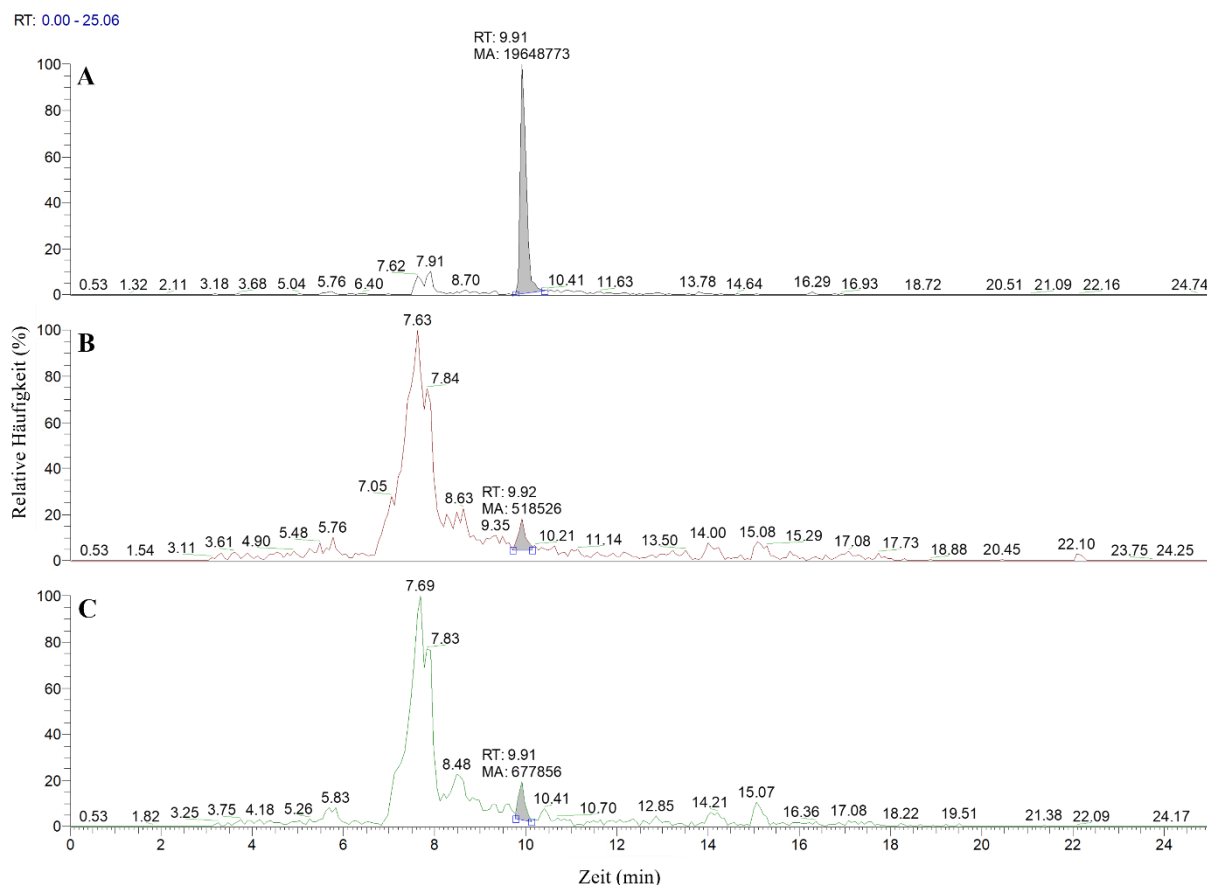
**Abbildung 28: LC-MS/MS-basierter Nachweis von Pyrazinon 3 aus *H. pylori*-Kulturüberstand**

Für den Nachweis des AI-3-Moleküls 6-Ethyl-5-methyl-3-(2-methylsulfanylethyl)-2(1H)-pyrazinon (Pyrazinon 3) wurde das Molekül in *H. pylori*-Kulturmedium als Positivkontrolle formuliert (A). Der sterile Kulturüberstand von *H. pylori* DSM 21031 nach 24 h wurde als Probe (B) und das *H. pylori*-Kulturmedium wurde als Negativkontrolle mitgeführt (C). Die Proben wurden anschließend mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion extrahiert und die Extrakte mittels LC-MS/MS durch Alexander Croon (Fraunhofer IME) gemessen.



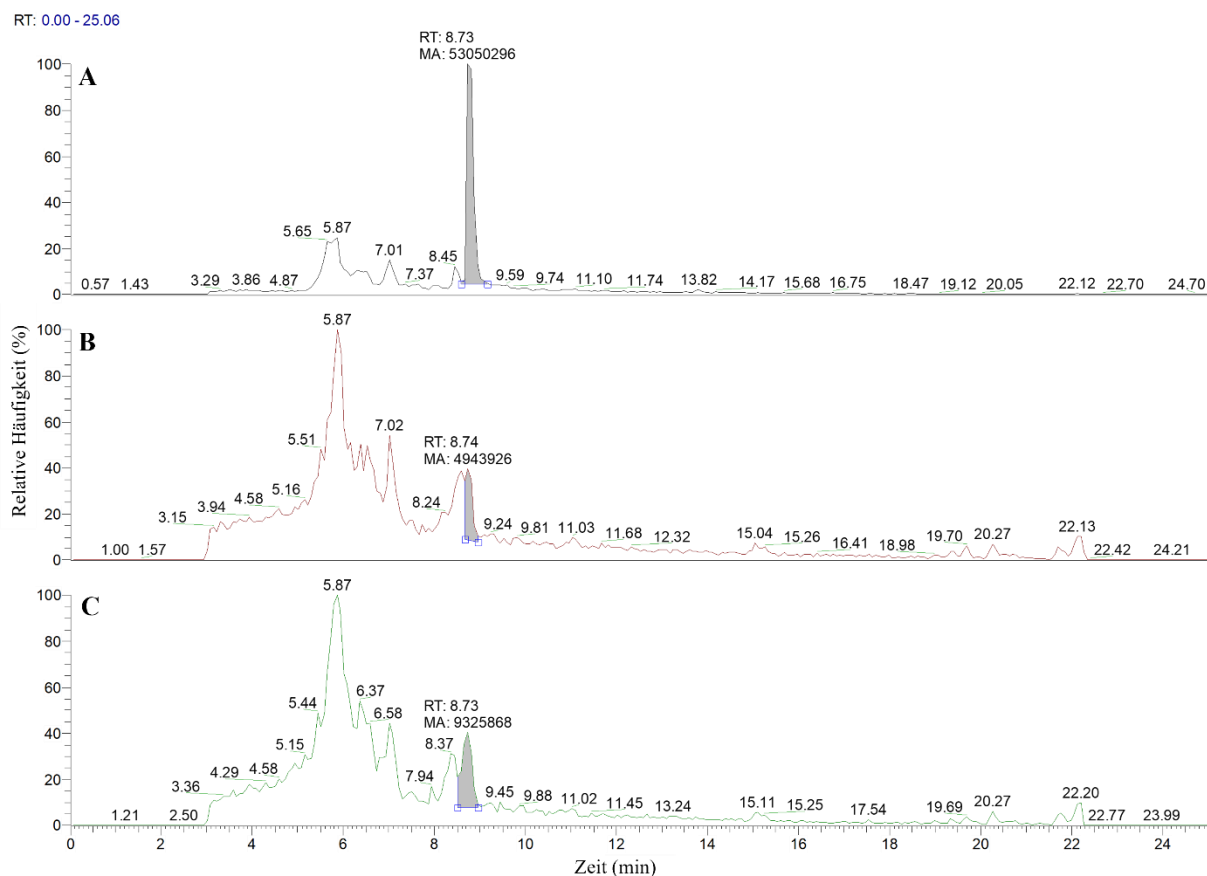
**Abbildung 29: LC-MS/MS-basierter Nachweis von Pyrazinon 5 aus *H. pylori*-Kulturüberstand**

Für den Nachweis des AI-3-Moleküls 3-Benzyl-5-methyl-2(1H)-pyrazinon (Pyrazinon 5) wurde das Molekül in *H. pylori*-Kulturmedium als Positivkontrolle formuliert (**A**). Der sterile Kulturüberstand von *H. pylori* DSM 21031 nach 24 h wurde als Probe (**B**) und das *H. pylori*-Kulturmedium wurde als Negativkontrolle mitgeführt (**C**). Die Proben wurden anschließend mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion extrahiert und die Extrakte mittels LC-MS/MS durch Alexander Croon (Fraunhofer IME) gemessen.



**Abbildung 30: LC-MS/MS-basierter Nachweis von Pyrazinon 8 aus *H. pylori*-Kulturüberstand**

Für den Nachweis des AI-3-Moleküls 5-Methyl-3-sec-butyl-2(1H)-pyrazinon (Pyrazinon 8) wurde das Molekül in *H. pylori*-Kulturmedium als Positivkontrolle formuliert (**A**). Der sterile Kulturüberstand von *H. pylori* DSM 21031 nach 24 h wurde als Probe (**B**) und das *H. pylori*-Kulturmedium wurde als Negativkontrolle mitgeführt (**C**). Die Proben wurden anschließend mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion extrahiert und die Extrakte mittels LC-MS/MS durch Alexander Croon (Fraunhofer IME) gemessen.



**Abbildung 31: LC-MS/MS-basierter Nachweis von Pyrazinon 10 aus *H. pylori*-Kulturüberstand**

Für den Nachweis des AI-3-Moleküls 3-Isopropyl-5-methyl-2-(1H)-pyrazinon (Pyrazinon 10) wurde das Molekül in *H. pylori*-Kulturmedium als Positivkontrolle formuliert (A). Der sterile Kulturüberstand von *H. pylori* DSM 21031 nach 24 h wurde als Probe (B) und das *H. pylori*-Kulturmedium wurde als Negativkontrolle mitgeführt (C). Die Proben wurden anschließend mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion extrahiert und die Extrakte mittels LC-MS/MS durch Alexander Croon (Fraunhofer IME) gemessen.

## 7.3 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
A	Absorption
AGS	Humane Zellen aus dem Adenokarzinom des Magens
AI	Autoinducer
AIP	Autoinducer Peptide
AlpA	Adherence-Associated Lipoprotein A
AU	Arbitrary Units
BabA	Blood Group Antigen-Binding Adhesion
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
CagA	Zytotoxin-assoziiertes Gen A
cagPAI	Zytotoxin-assoziierte Gene-Pathogenitätsinsel
Ct	Cycle Threshold
difH	Tyrosin-Rekombinase Erkennungssequenzen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DPD	4,5-Dihydroxy-2,3-entandion
FKS	Fetales Kälberserum
GRAS	Generally Recognized As Safe
hE	humane Erythrozyten
HopQ	Outer Mebrane Protein Q
HtrA	High Temperature Requirement A
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
IceA	Induced By Contact With Epithelium
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektroskopie-Kopplung
MALT	Schleimhaut-assoziiertes lymphoides Gewebe
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute
MOI	Multiplicity Of Infection
MPa	Megapascal
MQED	1-(3-Methyl-2chinoxaliny)-1,2-ethandiol
MTP	Mikrotiterplatte
NBT	Nitroblautetrazolium
nm	Nanometer
OipA	Outer Inflammatory Protein A
OPD	o-Phenylendiamin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
QqQ	Triple-Quadrupol Massenspektrometer
RPLP0	saures ribosomales 60S-Protein P0
rpm	Umdrehungen pro Minute
rpsL	Ribosomales Proteins S12
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RU	Response Unit
SabA	Sialic Acid-Binding Adhesion
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
sec	Sekunde
SOC	Super Optimal Broth With Catabolite Repression
SPR-Spektroskopie	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

ü.N.....	über Nacht
UHPLC .....	Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie
V .....	Volt
VacA.....	vakuolisierendes Zytotoxin

## 7.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung des Rekombinationssystems zur Erzeugung von genomischen Modifikationen .....	16
Abbildung 2: Plasmidkarte von pTZ17 für die Deletion des <i>cagA</i> -Locus .....	17
Abbildung 3: Infektion von humanen mukogenen Magenschleimhautzellen mit <i>H. pylori</i> .....	26
Abbildung 4: Derivatisierung von DPD zu MQED .....	40
Abbildung 5: <i>H. pylori</i> Wachstumskinetiken unter Einfluss unterschiedlicher AMPs - Teil 1 .....	51
Abbildung 6: <i>H. pylori</i> Wachstumskinetiken unter Einfluss unterschiedlicher AMPs - Teil 2 .....	52
Abbildung 7: Dosis-Wirksamkeitskurve von LL-37 anhand von <i>H. pylori</i> DSM 21031.....	53
Abbildung 8: Dosis-Wirksamkeitskurve von Nisin A anhand von <i>H. pylori</i> DSM 21031 .....	54
Abbildung 9: Zytotoxizität der AMPs.....	55
Abbildung 10: Hämolytische Aktivität der AMPs .....	56
Abbildung 11: Untersuchung des Peptids Buf IIIb auf enzymatische Hydrolyse durch Pepsin.....	58
Abbildung 12: Untersuchung des Peptids BAMP auf enzymatische Hydrolyse durch Pepsin .....	59
Abbildung 13: Untersuchung des Peptids LL-37 auf enzymatische Hydrolyse durch Pepsin .....	60
Abbildung 14: Untersuchung des Peptids Nisin A auf enzymatische Hydrolyse durch Pepsin.....	61
Abbildung 15: LC-MS/MS Chromatogramme für den Nachweis von AI-1 in <i>H. pylori</i> -Kulturüberstand.....	62
Abbildung 16: Chromatogramm zur Identifizierung eines AI-3-Moleküls in <i>H. pylori</i> -Kulturüberstand .....	63
Abbildung 17: Chromatogramm für den indirekten Nachweis von AI-2 in <i>H. pylori</i> -Kulturüberständen.....	68
Abbildung 18: Indirekte Quantifizierung der AI-2-Konzentration mittels LC-MS/MS.....	69
Abbildung 19: SPR-basierter Nachweis des VacA-Proteins in <i>H. pylori</i> -Kulturüberständen.....	71
Abbildung 20: DNA-Sequenz Alignment zum Nachweis der <i>iceA2</i> -Deletion.....	72
Abbildung 21: Vergleich der Kolonisierungseffizienz der <i>H. pylori</i> -Stämme DSM 21031 und HP4 .....	74
Abbildung 22: Zytokin-Titer nach der Infektion einer Magenschleimhautzelllinie mit <i>H. pylori</i> -Stämmen .....	75
Abbildung 23 Detektion des CagA-Proteins mittels Western-Blot.....	77
Abbildung 24: <i>H. pylori</i> Wachstumskinetiken unter Einfluss von AMPs - Teil 1 mit Standardabweichung ....	108
Abbildung 25: <i>H. pylori</i> Wachstumskinetiken unter Einfluss von AMPs - Teil 2 mit Standardabweichung ....	109
Abbildung 26: LC-MS/MS-basierter Nachweis von Pyrazinon 1 aus <i>H. pylori</i> -Kulturüberstand .....	110
Abbildung 27: LC-MS/MS-basierter Nachweis von Pyrazinon 2 aus <i>H. pylori</i> -Kulturüberstand .....	111
Abbildung 28: LC-MS/MS-basierter Nachweis von Pyrazinon 3 aus <i>H. pylori</i> -Kulturüberstand .....	112
Abbildung 29: LC-MS/MS-basierter Nachweis von Pyrazinon 5 aus <i>H. pylori</i> -Kulturüberstand .....	113
Abbildung 30: LC-MS/MS-basierter Nachweis von Pyrazinon 8 aus <i>H. pylori</i> -Kulturüberstand .....	114
Abbildung 31: LC-MS/MS-basierter Nachweis von Pyrazinon 10 aus <i>H. pylori</i> -Kulturüberstand .....	115

## 7.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bakterienstämme und Zelllinien .....	13
Tabelle 2: Antimikrobielle Peptide .....	14
Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.....	16
Tabelle 4: PCR-Ansatz.....	30
Tabelle 5: PCR-Programm.....	30
Tabelle 6: RT-PCR-Ansatz .....	31
Tabelle 7: RT-PCR-Programm .....	31
Tabelle 8: Enzymatische Restriktion von DNA-Proben .....	32
Tabelle 9: Ansatz für eine Klonierung mittels NEBuilder® HiFi DNA Assembly.....	33
Tabelle 10: Probenvorbereitung für SDS-PAGE .....	35
Tabelle 11: Prozessschritte SPR-Analyse .....	38
Tabelle 12: Trennverfahren der AI-1 mittels UHPLC .....	42
Tabelle 13: Trennverfahren des derivatisierten DPD mittels UHPLC .....	44
Tabelle 14: Produktmassen des DPD-Derivats .....	45
Tabelle 15: Trennverfahren der AI-3 mittels UHPLC .....	46

Tabelle 16: Trennverfahren für Pepsin hydrolysierte AMPs mittels UHPLC .....	48
Tabelle 17: Übersicht über die Klonierungsansätze zur Generierung der Deletionsplasmide .....	65
Tabelle 18: Übersicht über die <i>H. pylori</i> Stammentwicklung .....	67
Tabelle 19: Primer .....	118
Tabelle 20: Agar und Medien .....	119
Tabelle 21: Puffer, Stammlösungen und Arbeitslösungen .....	121
Tabelle 22: Autoinducer-Standards & Reagenzien .....	124
Tabelle 23: Antikörper, Chemikalien, Enzyme und Kulturbestandteile .....	125
Tabelle 24: Verbrauchsmaterialien und Kits .....	126
Tabelle 25: Geräte .....	128
Tabelle 26: Software .....	130

## 7.6 Primer

Tabelle 19: Primer

Name	FW/RV	5'→3' Sequenz
P31 <sup>1</sup>	FW	AGGGGTTTGTACTAGGGTTTATACGACTACCCCTAAGAAAGCCTAACTCG
P32 <sup>1</sup>	RV	GAACGATGTGGTATTTCACACCGGGTAAATCCCTAACCCTACCCCCACG
P33	FW	GGGAACAGGCATGTATAAGA
P34	RV	CGTCGAACATCATCTTATTGAT
P41	FW	GCTATTGCCTTGCAACAAATCC
P42	RV	CGTGGCTTTAGCGGGATGC
P52	FW	GTAAAACGACGGCCAGT
P53	RV	GGAAACAGCTATGACCATG
P54	FW	CTTTTAAATTTGGGATATATCGCTAGTGTCGATCACTAGTGAATTCGC
P55	RV	ATTCCCGCAATTTGACATCATTTCAGGGGCTTTGGATCGAATTC
P56	FW	ATGGCGGCCGCGGAATTCGATCCAAAGCCCTGCAAAAATGATGTCAAATTGC
P57	RV	CTGCACTTTTCAAACCTTTTAAATCTCGAGGGCTGATTGGTTTGGGGAATG
P58	FW	GGGTAAAAATCATTCCCAAACCAATCAGCCCTCGAGATTTAAAAGTTGAAAAGTGC
P69	RV	ATGAATAAAGGAGTTAAAAACATGAAAACAAGGATCCATCGATCATTTAGTTATGAAAAC
P60	FW	AGTTTTTCATAACTAAATGATCGATGGATCCGTTTTTCATGTTTTTAACTCC
P61	RV	GCAGGCGGCCGCGAATTCCTAGTGATACGGACTAGCGATATATCC
P69	FW	CCTTATCGATTCAAGTGC
P70	RV	GTTAATCCATAGTTATAAAGC
P72	FW	CCTCGAGATTTAAAAGTTTGAAAAGTGC
P73	RV	GGATCCATCGATCATTTAGTTATGAAAAC
P74	FW	ATGGCGGCCGCGGAATTCGATCCAAAGCCGATGGTTTTTGAACTTTAGC
P75	RV	CTGCACTTTTCAAACCTTTTAAATCTCGAGGTTTTTTCCTTCTTCTGTGAAAACG
P76	FW	AGTTTTTCATAACTAAATGATCGATGGATCCATACCGCTCTTAAACCCATGC
P77	RV	GCAGGCGGCCGCGAATTCCTAGTGATACGGCTGGATTGGGTTAGTCATTCC
P78	FW	CGTATCACTAGTGAATTCGC
P79	RV	GGCTTTGGATCGAATTC
P80	FW	ATGGCGGCCGCGGAATTCGATCCAAAGCCCTCTTTGATATCATCAGAG
P81	RV	CTGCACTTTTCAAACCTTTTAAATCTCGAGGTGTTTCTCCTTACTATACCTAG

Name	FW/RV	5'→3' Sequenz
P82	FW	AGTTTTCATAACTAAATGATCGATGGATCCAGGATTAAGGAATACCAAAAAACG
P83	RV	GCAGGCGGCCCGCGAATTCAGTAGTGATACGCCAAAAAGGGGCTATAGC
P107	FW	CCAAAACCATCACAAAGGATCG
P108	FW	CGTTTTAGGGACTCTTGAGG
P109	RV	GCCAAACTAATCGCTTATATCCC
P110	FW	ATGGCGGCCCGCGGAATTCGATCCAAAGCCCAAATCAATGATGGATTAGTGG
P111	RV	CTGCACTTTTCAAACCTTTTAAATCTCGAGGGCCATTATAAACCTCTAAATATAAATTG
P112	FW	TTTTCATAACTAAATGATCGATGGATCCATTCATAAAAGGACCTACTAGAAAATAGG
P113	RV	GCAGGCGGCCCGCGAATTCAGTAGTGATACGCCAAAGGGCGTATAAATAGC
P114	RV	GCTAAAATACTGCCTTGAACCTC
P125	FW	GCTCTAAATCCCAACCAGAAACG
P126	RV	CCATCCCCAAAAGCATGC
P202 <sup>2</sup>	FW	TTTGTTAGAGAAGATAATGACGGTATCTAAC
P203 <sup>2</sup>	RV	CATAGGATTCACACCTGACTGACTAT
P204 <sup>3</sup>	FW	CAGGTGTTGACAATGGCAGCA
P205 <sup>3</sup>	RV	CAGACACTGGCAACATTGCGGA

FW = Forward; RV = Reverse; P = Primer; orange = homologe Überhänge; rot = Mutation; <sup>1</sup> = Ursprung: Dailidene *et al.* 2006; <sup>2</sup> = Ursprung: Boccellato *et al.* 2019; <sup>3</sup> = Ursprung Prof. Dr. Silja Wessler (PLUS, Salzburg, AT).

## 7.7 Agar und Medien

Tabelle 20: Agar und Medien

Name	Komponente	Konzentration	Anmerkung
ADF++	Advanced DMEM/F12	98 % (v/v)	Lagerung bei 4°C
	L-Glutamin	1 % (v/v)	
	HEPES	1 % (v/v)	
ADF+++	Advanced DMEM/F12	88 % (v/v)	Lagerung bei 4°C
	L-Glutamin	1 % (v/v)	
	HEPES	1 % (v/v)	
	FKS	10 % (v/v)	
AGS-Medium	DMEM, hoher Glukosegehalt	90 % (v/v)	Lagerung bei 4°C
	FKS	10 % (v/v)	
ALI-Medium	Wnt3a-Medium	50 % (v/v)	Wnt3a-, R-Spondin 1-Medium und ADF++ im Wasserbad bei 37°C temperieren, alle anderen Komponenten wurden auf Eis aufgetaut, Lagerung des finalen Mediums bei 4°C
	R-Spondin 1-Medium	25 % (v/v)	
	ADF++	18,5 % (v/v)	
	B27	2 % (v/v)	
	N2	1 % (v/v)	
	Penicillin-Streptomycin (optional)	1 % (v/v)	

Name	Komponente	Konzentration	Anmerkung
	EGF	20 ng · µL <sup>-1</sup>	
	FGF-10	150 ng · µL <sup>-1</sup>	
	Noggin	150 ng · µL <sup>-1</sup>	
	Gastrin I	10 nM	
	Nicotinamid	10 mM	
	ROCK-I	1,5 / 7,5 µM	
	Alk-I	1 µM	
GC-Agar	GC-Agar	36 g · L <sup>-1</sup>	GC-Agar und Proteose Pepton
	Proteose Pepton	15 g · L <sup>-1</sup>	ad 1 L MilliQ, autoklavieren
	Vitaminmix	1 % (v/v)	und Zugabe restlicher
	Pferdeserum	10 % (v/v)	Komponenten bei 45°C, pH
	Nystatin	0,01 % (v/v)	7,2, Lagerung bei 4°C
	Trimethoprim	0,1 % (v/v)	
HP-Agar	BHI	37 g · L <sup>-1</sup>	BHI und Agar-Agar ad 1 L
	Agar-Agar	15 g · L <sup>-1</sup>	MilliQ, autoklavieren, Zugabe
	Pferdeblut, defibriniert	5 % (v/v)	Pferdeblut und Antibiotikum,
	Chloramphenicol (optional)	0,01 g · L <sup>-1</sup>	pH 7,4, Lagerung bei 4°C
	Streptomycin (optional)	0,01 g · L <sup>-1</sup>	
HP-Einfriermedium	HP-Medium	50 % (v/v)	Lagerung bei 4°C
	Glycerol, 50 % (v/v)	50 % (v/v)	
HP-Medium	BHI	37 g · L <sup>-1</sup>	BHI ad 1 L MilliQ,
	FKS	10 % (v/v)	autoklavieren, Zugabe von
			FKS bei RT, pH 7,4,
			Lagerung bei 4°C
HP-Medium 2	Brucella-Bouillon	28,1 g · L <sup>-1</sup>	Brucella-Bouillon ad 1 L
	FKS	10 % (v/v)	MilliQ, autoklavieren, Zugabe
			von FKS bei RT, pH 7,0,
			Lagerung bei 4°C
LB-Agar	Hefeextrakt	5 g · L <sup>-1</sup>	Ad 1 L MilliQ, autoklavieren,
	Trypton	10 g · L <sup>-1</sup>	Zugabe Antibiotikum bei
	Natriumchlorid	10 g · L <sup>-1</sup>	einer Temperatur ≤ 60°C, pH
	Agar	15 g · L <sup>-1</sup>	7,0, Lagerung bei 4°C
LB-Medium	Hefeextrakt	5 g · L <sup>-1</sup>	Ad 1 L MilliQ, autoklavieren,
	Trypton	10 g · L <sup>-1</sup>	pH 7,0, Zugabe Antibiotikum
	Natriumchlorid	10 g · L <sup>-1</sup>	bei einer Temperatur ≤ 60°C,
TSB-Medium	Pepton aus Casein	17 g · L <sup>-1</sup>	Ad 1 L MilliQ, autoklavieren,
	Pepton aus Sojamehl	3,0 g · L <sup>-1</sup>	pH 7,3
	D(+)-Glukose	2,5 g · L <sup>-1</sup>	
	Natriumchlorid	5,0 g · L <sup>-1</sup>	
	Dikaliumhydrogenphosphat	2,5 g · L <sup>-1</sup>	

## 7.8 Puffer, Lösungen, Peptide und Autoinducer-Standards

Tabelle 21: Puffer, Stammlösungen und Arbeitslösungen

Name	Komponente	Konzentration	Anmerkung
Agarosegel (0,8 %, 1,2 %) für die Gelelektrophorese	Agarose	8 bzw. 12 g · L <sup>-1</sup>	Agarose einwiegen und mit TBE-Puffer (1x) entsprechend auffüllen, Ansatz aufkochen, Zugabe Ethidiumbromid bei ≤ 60°C
	TBE-Puffer (1x)	-	
	Ethidiumbromid	25 µL · L <sup>-1</sup>	
Agarosegel (0,2 %) zur Reduktion der Verdunstung in MTPs	Agarose	0,2 g · L <sup>-1</sup>	Agarose in MilliQ einwiegen, Ansatz aufkochen, Abkühlen ≤ 60°C vor Verwendung
AI-1 Extraktionslösung	Essigsäureethylester	99 % (v/v)	
	Essigsäure	1 % (v/v)	
AP-Puffer	TRIS	12,1 g · L <sup>-1</sup>	pH 9,6, ad 1 L MilliQ
	Natriumchlorid	5,8 g · L <sup>-1</sup>	
	Magnesiumchlorid Hexahydrat	1 g · L <sup>-1</sup>	
Ampicillin-Lösung	Ampicillin, Natriumsalz	100 mg · mL <sup>-1</sup>	Gelöst in 50 % (v/v) Ethanol, 0,2 µm filtriert, Lagerung bei -20°C, Arbeitskonzentration 50 µg · mL <sup>-1</sup>
Blockierungslösung	BSA	3 % (w/v)	Gelöst in PBS-T
Chloramphenicol-Lösung	Chloramphenicol	10 mg · mL <sup>-1</sup>	Gelöst in Ethanol, 0,2 µm filtriert, Lagerung bei -20°C, Arbeitskonzentration 10 µg · mL <sup>-1</sup>
DPD-Stammlösung	DPD, 4,16 mM in PBS (1x)	100 µM	Verdünnt in PBS (1x), Lagerung bei -20°C
Glycerol-Lösung	Glycerol	50 % (v/v)	0,2 µm filtriert
	MilliQ	50 % (v/v)	
HPS-EP	HEPES	10 mM	Ad 1 L MilliQ, 0,2 µm filtriert, pH 7,4
	NaCl	150 mM	
	Tween <sup>®</sup> 20	0,05 % (v/v)	
	EDTA	3 mM	

Name	Komponente	Konzentration	Anmerkung
Kollagen-Lösung	Kollagen	1 % (v/v)	Kollagen muss eine Temperatur von 4°C vor Zugabe haben
	Eisessig, 0,02 M, sterilfiltriert	99 % (v/v)	
Kanamycin-Lösung	Kanamycin-Sulfat	50 mg · mL <sup>-1</sup>	Gelöst in MilliQ, 0,2 µm filtriert, Lagerung -20°C, Arbeitskonzentration 50 µg · mL <sup>-1</sup>
Lysis-Puffer	TRIS, 1 M	20 mM	Alle Lösungen wurden als Konzentrate angesetzt, Zugabe der Chemikalien nach SDS erfolgte separat, Lagerung bei 4°C
	EDTA, 100 mM	1 mM	
	NaCl, 1 M	100 mM	
	Triton™ X-100, 10 % (w/v) in MilliQ	1 % (v/v)	
	Deoxycholsäure, Natriumsalz, 10 % (w/v) in MilliQ	0,5 % (v/v)	
	SDS, 10 % (w/v) in MilliQ	0,1 % (v/v)	
	cOmplete™, EDTA-frei, 25x	1x	
	Natriumfluorid, 1 M	20 mM	
	β-Glycerophosphat, 1 M	20 mM	
	Natriumorthovanadat, 1 M	1 mM	
Natriummolybdat, 1 M	1 mM		
Methanol, 5 %	Methanol	5 % (v/v)	
Mobile Phase A1	Methanol	5 % (v/v)	Entgast
	Ameisensäure	0,1 % (v/v)	
	MilliQ	94,9 % (v/v)	
Mobile Phase A2	Acetonitril	5 % (v/v)	Entgast
	Ameisensäure	0,1 % (v/v)	
	MilliQ	94,9 % (v/v)	
Mobile Phase B1	Methanol	95 % (v/v)	Entgast
	Ameisensäure	0,1 % (v/v)	
	MilliQ	4,9 % (v/v)	
Mobile Phase B2	Acetonitril	95 % (v/v)	Entgast
	Ameisensäure	0,1 % (v/v)	
	MilliQ	4,9 % (v/v)	
Natriumcarbonat-Lösung	Natriumcarbonat	0,7 M	pH 11,1
NBT/BCIP	NBT	0,33 g · L <sup>-1</sup>	Suspension in DMF, Lagerung -20°C
	BCIP	0,167 g · L <sup>-1</sup>	
Nystatin	Nystatin Dihydrat	10 mg · L <sup>-1</sup>	Gelöst in DMSO, 0,2 µm filtriert, Dunkel lagern, Lagerung -20°C

Name	Komponente	Konzentration	Anmerkung
OPD-Stammlösung	OPD	100 mM	Gelöst in MilliQ, lichtsensitiv, dunkel lagern
PBS (10x)	Natriumchlorid	80 g · L <sup>-1</sup>	Ad 1 L MilliQ, pH 7,4, für PBS (1x) in MilliQ 1:10 verdünnen
	Kaliumchlorid	2 g · L <sup>-1</sup>	
	Kaliumdihydrogenphosphat	2 g · L <sup>-1</sup>	
	Dinatriumhydrogenphosphat Dodecahydrat	29 g · L <sup>-1</sup>	
PBS-T	PBS (10x)	10 % (v/v)	pH 7,4
	Tween-20	0,05 % (v/v)	
	MilliQ	89,5 % (v/v)	
Pepsin-Stammlösung	Pepsin vom Schwein, 3528 U · mg <sup>-1</sup>	9383 U · mL <sup>-1</sup>	Gelöst in Reaktionslösung (1x) durch Inkubation für 20 min bei 37°C im Wasserbad und durch anschließendes Vortexen
Reaktionslösung (5x)	HCl	50 mM	Ad 1 L MilliQ, pH 0,9 für Reaktionslösung (1x) 1:5 in MilliQ verdünnen
	NaCl	5 % (w/v)	
SDS-Lösung	SDS	0,4 % (w/v)	Lagerung 4°C
	AGS-Medium	99,96 (v/v)	
Streptomycin-Lösung	Streptomycinsulfat	10 mg · mL <sup>-1</sup>	Gelöst in MilliQ, 0,2 µm filtriert, Lagerung bei -20°C, Arbeitskonzentration 10 µg · mL <sup>-1</sup>
TBE-Puffer (10x)	TRIS	108 g · L <sup>-1</sup>	Ad 1 L MilliQ, pH 8,3, für TBE-Puffer (1x) 1:10 in MilliQ verdünnen
	Borsäure	55 g · L <sup>-1</sup>	
	EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	7,5 g · L <sup>-1</sup>	
Transfer-Puffer	TRIS	0,6 g · L <sup>-1</sup>	pH 8,3, Lagerung bei 4°C
	Glycin	12,6 g · L <sup>-1</sup>	
	Methanol	20 % (v/v)	
Trimethoprim	Trimethoprim	2,5 mg · L <sup>-1</sup>	Gelöst in DMSO, 0,2 µm filtriert, Lagerung bei -20°C
Triton™ X-100-Lösung	Triton™ X-100	1 % (w/v)	
	DPBS	99 % (v/v)	
Vitaminmix	Adenin	1 g · L <sup>-1</sup>	Ad 1 L MilliQ, 0,2 µm filtriert, Lagerung bei -20°C, Zur Verfügung gestellt durch Prof.
	Arginin	150 mg · L <sup>-1</sup>	
	<i>p</i> -Aminobenzoesäure	13 mg · L <sup>-1</sup>	
	Carboxylase	100 mg · L <sup>-1</sup>	

Name	Komponente	Konzentration	Anmerkung
	L-Cystein-HCl	26 g · L <sup>-1</sup>	Wessler, PLUS, Salzburg,
	L-Cystein	1,1 g · L <sup>-1</sup>	AT
	Dextrose	100 g · L <sup>-1</sup>	
	Eisen(III)-nitrat	20 mg · L <sup>-1</sup>	
	L-Glutamin	10 g · L <sup>-1</sup>	
	Guanin	30 mg · L <sup>-1</sup>	
	β-NAD	250 mg · L <sup>-1</sup>	
	Thiamin	3 mg · L <sup>-1</sup>	
	Uracil	500 mg · L <sup>-1</sup>	
	Vitamin B12	10 mg · L <sup>-1</sup>	

Tabelle 22: Autoinducer-Standards &amp; Reagenzien

AI-Typ	Alias	Name	Konzentration	<i>M</i> (g · mol <sup>-1</sup> )	Hersteller
AI-1		<i>N</i> -Butyryl-L-	1 mg · mL <sup>-1</sup> in	171,19	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
		Homoserinlacton	MilliQ		
		<i>N</i> -Hexanoyl-L-	1 mg · mL <sup>-1</sup> in	199,25	
		Homoserinlacton	MilliQ		
		<i>N</i> -(3-Hydroxybutanoyl)-L-	1 mg · mL <sup>-1</sup> in	187,19	
		Homoserinlacton	MilliQ		
		<i>N</i> -(β-Ketocaproyl)-L-	1 mg · mL <sup>-1</sup> in	213,23	
		Homoserinlacton	MilliQ		
		<i>N</i> -(3-Oxoocctanoyl)-L-	1 mg · mL <sup>-1</sup> in	241,28	
	Homoserinlacton	MilliQ			
AI-2	DPD (AI-2 Vorstufe)	4,5-Dihydroxy-2,3- pentandion	4,71 mM in MilliQ	132,12	Carbosynth Limited, Berkshire, UK
AI-3	Pyrazinon 1	5-Isopropyl-3-(2- methylsulfanylethyl)- 2(1H)-pyrazinon	Unbekannt <sup>1</sup> , in DMSO	212,31	Prof. Crawford, Yale University
	Pyrazinon 2	5-Methyl-3-(2- methylsulfanylethyl)- 2(1H)-pyrazinon	1 mg · mL <sup>-1</sup> in DMSO	184,26	
	Pyrazinon 3	6-Ethyl-5-methyl-3-(2- methylsulfanylethyl)- 2(1H)-pyrazinon	1 mg · mL <sup>-1</sup> in DMSO	212,31	
	Pyrazinon 4	3-Isobutyl-5-methyl- 2(1H)-pyrazinon	1 mg · mL <sup>-1</sup> in DMSO	166,22	
	Pyrazinon 5	3-Benzyl-5-methyl-2(1H)- pyrazinon	Unbekannt in DMSO	200,24	

AI-Typ	Alias	Name	Konzentration	$M$ (g · mol <sup>-1</sup> )	Hersteller
	Pyrazinon	5-Methyl-3-sec-butyl-	1 mg · mL <sup>-1</sup> in	166,22	
8		2(1H)-pyrazinon	DMSO		
	Pyrazinon	3-Isopropyl-5-methyl-2-	1 mg · mL <sup>-1</sup> in	152,19	
10		(1H)-pyrazinon	DMSO		

<sup>1</sup> = Pyrazinon 1 wurde ohne bekannte Masse zur Verfügung gestellt, weshalb die gesamte Masse in 1 mL gelöst wurde; AI = Autoinducer;  $M$  = Molare Masse

## 7.9 Antikörper, Chemikalien und Zellkulturbestandteile

**Tabelle 23: Antikörper, Chemikalien, Enzyme und Kulturbestandteile**

Material	Hersteller
[Leu <sup>15</sup> ]-Gastrin I Human	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Advanced DMEM/F12, kein L-Glutamin & HEPES	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
alamarBlue™ HS Zellviabilitätsreagenz	Thermo Fisher Scientific Inc.
Alkaline Phosphatase AffiniPure™ <i>Goat Anti-Rabbit</i>	Jackson ImmunoResearch, Europe Ltd., Ely, UK
IgG, FCγ Fragment-spezifisch, polyklonal	
B-27™ Supplement (50x), serumfrei	Thermo Fisher Scientific Inc.
BamHI-HF®	New England Biolabs GmbH
cOmplete™, EDTA-freier Proteasehemmer-Cocktail	Roche Holding AG, Basel, CH
DMEM, hoher Glukosegehalt, nur für AGS-Zellen	Thermo Fisher Scientific Inc.
DPBS, ohne Kalzium, ohne Magnesium	Thermo Fisher Scientific Inc.
EcoRI-HF®	New England Biolabs GmbH
EcoRV-HF®	New England Biolabs GmbH
Fetales Kälberserum, steril-filtriert (Bestandteil des ALI-Mediums)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Fetales Kälberserum, Hitze-inaktiviert (Für die Kultivierung von <i>H. pylori</i> und AGS-Zellen)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Gibco™ Human EGF Recombinant Protein	Thermo Fisher Scientific Inc.
HindIII-HF®	New England Biolabs GmbH
Ibidi Freezing Medium Classic	Ibidi GmbH, Gräfelfing, DE
Kollagen Typ-I, Bovin	Thermo Fisher Scientific Inc.
L-Glutamin 100X, 200 mM	Biowest SAS, Nuaillé, FR
LL-37, 1 mg, antimikrobielles Peptid	InvivoGen Europe
Monoklonaler Maus IgG <sub>1</sub> VacA (5E4) Antikörper, 200 µg · mL <sup>-1</sup>	Santa Cruz Biotechnology, Texas, US
N-2 Supplement (100X)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Natriumcitrat-Lösung 3,13 % Eifelfango®	Eifelfango Chemisch Pharmazeutisches Werk GmbH & Co. KG, Bad Neuenahr-Ahrweiler, DE
Nicotinamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Nisin Ready Made Solution, 38134 IU · mL <sup>-1</sup> in 0,02 M HCl (Nisin A)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Material	Hersteller
<i>o</i> -Phenylendiamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Penicillin-Streptomycin, 10.000 Units Penicillin und 10 mg Streptomycin pro mL, 0,1 µm filtriert	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Pepsin vom Schwein, lyophilisiertes Pulver, ≥ 3200 U · mg <sup>-1</sup>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Pferdeblut, defibriniert	Thermo Fisher Scientific Inc.
Pferdeserum, sterilfiltriert	Biowest SAS
Polyklonaler Hase CagA3 Antikörper, Anti-CagA N-terminal	Paul Ehrlich Institut, Langen, DE
Polyklonaler Hase HtrA Antikörper	Paul Ehrlich Institut
Recombinant Human FGF-10	PeptoTech GmbH, Hamburg, DE
Recombinant Human Noggin	PeptoTech GmbH
ROTI® Cell HEPES-Lösung, CELLPURE® 1 M, steril	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
ROTI®Quant, 5x Konzentrat	Carl Roth GmbH & Co. KG
R-Spondin 1-Medium, konditioniert	Prof. Wessler, PLUS, Salzburg, AT
SOC, Medium	New England Biolabs GmbH
TGF-β RI Kinase Inhibitor IV (ALK-I)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
TRIzol™ Reagenz	Thermo Fisher Scientific Inc.
TrypLE™ Express Enzym (1x), Phenolrot	Thermo Fisher Scientific Inc.
Wnt3A-Medium, konditioniert	Prof. Wessler, PLUS
XhoI-HF®	New England Biolabs GmbH
Y-27632-Dihydrochlorid (ROCK-I)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

## 7.10 Verbrauchsmaterialien und Kits

**Tabelle 24: Verbrauchsmaterialien und Kits**

Material	Hersteller
1 kbp DNA-Leiter, 50 µg (DNA-Längenmarker)	Carl Roth GmbH + Co. KG
24-Well CytoOne® Platte, unbehandelt	STARLAB GmbH, Hamburg, DE
96-Well PCR Platten, weiß (Anwendung: RT-PCR)	Thermo Fisher Scientific Inc.
96-Well-MTP, Polystyrol, F-Boden, transparent, Microlon, <i>High Binding</i> , unsteril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
96-Well-MTP, Polystyrol, F-Boden, transparent	Greiner Bio-One GmbH
CELLSTAR®, TC, Abdeckplatte mit Kondensationsringen, steril, einzeln verpackt	
96-Well-MTP, Polystyrol, <i>Half Area</i> , schwarz	Greiner Bio-One GmbH
96-Well-MTP, U-Boden, Polypropylen	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
Amersham™ Protran® Nitrocellulose Blotting Membran, 0,2 µm	Cytiva, Marlborough, US

Material	Hersteller
Amine Coupling Kit	Cytiva
BAKERBOND spe™ C18 SPE-Säule, 500 mg Säulenbettgewicht, 3 mL Säulenkapazität	Avantor Inc., Radnor, US
Cap w/PTFE/Rubber Seal For 9mm Screw Vial (Kappe für Kurzgewindeflasche)	OMNILAB-LABORZENTRUM GmbH & Co. KG, Bremen, DE
CASYcups	OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen, DE
CASYton Puffer	OMNI Life Science GmbH & Co. KG
CELLSTAR® Zellkulturflaschen (T25, T75)	Greiner Bio-One GmbH
CM5 S-Series Chip Biacore	Cytiva
Combitips advanced® 5 mL, steril	Eppendorf AG, Hamburg, DE
DisQuE™ 2 mL Reaktionsgefäß	Waters Corporation, Milford, US
Ethanolamin-HCl (1 M, pH 8,5)	Cytiva
Falcon Reaktionsgefäß (15 und 50 mL)	Greiner Bio-One GmbH
FlowerPlate® 48-Well-MTP, flower, ohne Optoden	Beckman Coulter GmbH, Aachen, DE
Gas-permeable Folie mit Verdunstungsschutzschicht	Beckman Coulter GmbH
Gel Loading Dye, Purple (6x)	New England Biolabs GmbH
Haftmatte für Schüttler Varioshake VS-8-Serie und VS 60 OI	Carl Roth GmbH & Co. KG
Human Luminex® Discovery Assay	R&D Systems, Inc., Minneapolis, US
Kurzgewindeflasche, 1,5 mL, Klarglas, weite Öffnung	OMNILAB-LABORZENTRUM GmbH & Co. KG
Mikroeinsatz, 0,1 mL, Klarglas (Einsatz für Kurzgewindeflasche)	OMNILAB-LABORZENTRUM GmbH & Co. KG
Millicell® Zellkultureinsatz, 12 mm, Polykarbonat, 0,4 µm	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Mischgas (3 % H <sub>2</sub> , 5 % O <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub> , 87 % N <sub>2</sub> ) für die mikroaerophile Kultivierung	Westfalen AG, Münster, DE
Mix2Seq Kit NXP (Sequenzierungskit)	Eurofins Genomics Europe Shared Services GmbH, Ebersberg, DE
Mouse Antibody Capture Kit	Cytiva
NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix	New England Biolabs GmbH
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, Mini Kit für Gelextraktion und PCR Clean	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, DE
NucleoSpin Plasmid, Mini Kit für Plasmid DNA	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Nunc™ Edge™ 2.0 96-Well-MTP, flacher Boden	Thermo Fisher Scientific Inc.
NuPage™ 4–12 %, Bis-Tris Gel	Life Technologies AG, Carlsbad, US
NuPage™ LDS-Probenpuffer (4x)	Life Technologies AG
NuPage™ MES SDS-Laufpuffer (20x)	Life Technologies AG
NuPage™ Probenreduktionsmittel (10x)	Life Technologies AG
Omnifix® Spritzen, 1-20 mL	B. Braun SE, Melsungen, DE

Material	Hersteller
Optische adhäsive Folie (Anwendung: RT-PCR)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Oxoid™ CampyGen™ 2.5 L-Beutel	Thermo Fisher Scientific Inc.
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10–180 kDa)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Phenix™-RC 4mm Syringe Filter, 0,2 µm	Phenomenex Inc., Torrance, US
Pierce™ Rinderserumalbumin-Standards	Thermo Fisher Scientific Inc.
Pipette (1, 5, 10, 25, 50 mL), steril	Greiner Bio-One GmbH
Power SYBR™ Green RNA-to CT™ 1-Step Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.
Protein LoBind® Reaktionsgefäß (1,5, 2, 5 mL)	Eppendorf AG
Q5® High-Fidelity 2X Master Mix	New England Biolabs GmbH
Sartorius® Claristep Spritzenloser Filter 17C07FT - 480, 0,2 µm regenerierte Cellulose	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, DE
Spritzenfilter ROTILABO® Polyvinylidenfluorid, 0,2 µm, 15 mm, steril	Carl Roth GmbH & Co. KG
Sterican® Kanüle, 0,6 x 30 mm	B. Braun SE
Trypanblau-Lösung, 0,4 %	Thermo Fisher Scientific Inc.
Venofix® Safety, Nadel: 0,65 x 19 mm, Länge: 30 cm	B. Braun Melsungen AG
Verschlussfolie für Mikrottestplatten Aluminium, Stärke 64 µm, unsteril	Carl Roth GmbH & Co. KG
Whatman™ Grade 3MM Chr Chromatographiepapier	Cytiva

## 7.11 Geräte und Software

**Tabelle 25: Geräte**

Gerät	Hersteller
Anaerobier-Kammer für 48-Well-MTP (Verwendung im BioLector Pro)	Beckman Coulter GmbH
Analysewaage TE64	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Arium® pro	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Ascentis® Express C18, 2,7 µm, 150 x 2,1 mm, 90Å	Merck KGaA
Basic pH-Meter PB-11	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Biacore T200	Cytiva
BioLector® Pro	Beckman Coulter GmbH
Biophotometer 6131	Eppendorf AG
Blotting Kammer Novex XCell II	Life Technologies AG
CASY TT Zellzähler	OMNI Life Science GmbH & Co. KG
CASY TT Zellzählssystem mit Analysator	Schärfe System, Reutlingen, DE
ChemStudio PLUS	Analytik Jena GmbH & Co. KG, Jena, DE
CLARIOstar®	BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, DE

Gerät	Hersteller
CLARIOstar® Plus mit Atmosphären Kontrolleinheit	BMG LABTECH GmbH
Concentrator 5301 (Vakuumkonzentrator)	Eppendorf AG
Dri Block DB3, Thermoblock	Thermo Fisher Scientific Inc.
Eismaschine IceMatic D201	Castel MAC Srl, Castelfranco Veneto, IT
Elektrophorese-Modul PowerPac HC	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, US
Eppendorf Research® plus, 8-Kanalpipette, mechanisch, (0,5–10 µL, 30–300 µL)	Eppendorf AG
Erlenmeyerkolben DURAN® Super Duty (100 mL)	Schott AG, Mainz, DE
FlexCycler <sup>2</sup>	Analytik Jena GmbH & Co. KG
Forma™ -86°C-Ultratiefkühlschrank der Serie 900, Probenlagerung bei -80°C	Thermo Fisher Scientific Inc.
Forma™ CO <sub>2</sub> -Inkubator der Serie II mit Wassermantel	Thermo Fisher Scientific Inc.
Gefrierschrank, Probenlagerung bei -20°C	Siemens AG, München, DE
Gel Doc XR+	Bio-Rad Laboratories GmbH
Heraeus Megafuge 40 R	Thermo Fisher Scientific Inc.
Magnetrührer IKA RCT Basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, DE
Massenflussregler für Gas	Beckman Coulter GmbH
Mikroskop CKX41	Olympus AG, Tokio, JP
Mini-Sub Cell GT System	Bio-Rad Laboratories GmbH
Mini-Zentrifuge Sprout® Plus, Blue Sprout	Heathrow Scientific, Vernon Hills, US
Multipipette® E3	Eppendorf AG
Multitron Standard (Inkubationsschüttler)	Infors AG, Bottmingen, CH
NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific Inc.
Neubauer-improved Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, DE
Oxoid™ AnaeroJar™ 2.5 L	Thermo Fisher Scientific Inc.
Pipetten Discovery Comfort (D1000, D200, D20, D10, D2)	Corning HTL SA, Warszawa, PL
Pipettierhelfer S1	Thermo Fisher Scientific Inc.
PowerPac™ Basic HC High-Current Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH
Präzisionswaage TE3102S	Sartorius Stedim Biotech GmbH
QuantStudio 3	Thermo Fisher Scientific Inc.
Sterilwerkbank BioWizard Golden GL-130	Kojair Tech Oy, Vilppula, FI
Stickstofftank Cryotherm Biosafe 220 SC	Cyrotherm GmbH & Co. KG, Kirchen/Sieg, DE
Stuart™ SSL3 Wippschüttler	Cole-Parmer® Instrument Company Ltd., St. Neots, UK
Thermomixer comfort	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Thermoschüttler MKR13	Hettich AG, Bäch SZ, CH

Gerät	Hersteller
TSQ Quantum Ultra (Triple Quad MS)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Ultimate™ 3000 HPLC	Thermo Fisher Scientific Inc.
Ultimate™ 3000 Mehrfachwellenlängen-Detektor	Thermo Fisher Scientific Inc.
Ultimate™ 3000 Säulenthermostat TCC-3000	Thermo Fisher Scientific Inc.
Ultimate™ LPG-3400RS Quaternäre Schnelltrennungspumpe	Thermo Fisher Scientific Inc.
Ultimate™ WPS-3000 TBFC MTP Autosampler mit Fraktionssammler	Thermo Fisher Scientific Inc.
Vakuum-Exsikkator VDR-25G mit Manometer, Nennvolumen = 10 L	Lab Logistics Group GmbH, Meckenheim, DE
MZ 2C Membran-Vakuumpumpe	VACUUBRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, DE
Vielkolbenschüttler, VKS 75 A control	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, DE
Vortex Genie 2	ELMI Ltd., Riga, LV
VWR UV-Transilluminator VWR LM-20E	VWR, Radnor, US
Wasserbad GFL 1008	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, DE
XCell4 SureLock Midi-Cell Electrophoresis System	Life Technologies AG
Zentrifuge 5415D	Eppendorf SE

Tabelle 26: Software

Name	Version	Hersteller	Funktion
Biacore™ T200 Software	n.a.	Cytiva	Kontrollsoftware, Biacore™ T200
BioLecton	3.16.74	Beckman Coulter GmbH	Kontrollsoftware, BioLector® Pro
Citavi	6	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, CH	Zitation
CLC Main Workbench 20	20.0.4	Qiagen N.V., Venlo, NL	Virtuelle Klonierung
Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides	n.a.	IBCEB, Tbilisi, US OCICB/NIAID/NIH, Bethesda, US	Datenbank für antimikrobielle Peptide
Design & Analysis 2	2.7	Thermo Fisher Scientific Inc.	Datenauswertung für RT-PCR
Excel	2013	Microsoft Corporation, Redmond, US	Datenauswertung
ExPASy PeptideCutter	n.a.	SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne, CH	Virtuelle Pepsin Hydrolyse

---

<b>Name</b>	<b>Version</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Funktion</b>
GraphPad Prism	9.0.0	GraphPad Software, Inc., San Diego, US	Datenauswertung
Image Lab	4.1	Bio-Rad Laboratories GmbH	Bildvisualisierung für Agarose-Gele
MARS	3.30	BMG LABTECH GmbH	Analysesoftware, CLARIOstar®
Microplate Reader Software	5.40	BMG LABTECH GmbH	Reader Kontrollsoftware, CLARIOstar®
NEBioCalculator®	1.15.5	New England Biolabs Inc., Waltham, US	Klonierung
Spyder (Anaconda3)	5.1.5	n.a.	BioLector® Pro Datenauswertung
TM Calculator	1.16.5	New England Biolabs, Inc.	PCR
Word	2013	Microsoft Corporation, Redmond, US	Dokumentation

---