

Aus der Medizinischen Klinik I für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin

DISSERTATION

**Lokale Immunantwort bei einer *Helicobacter pylori* Infektion
im Rahmen einer Impfstudie**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Irma Korten
aus Khoni, Georgien

Datum der Promotion: 09.09.2016

INHALTSVERZEICHNIS

ABSTRAKT	5
1 EINLEITUNG	8
1.1 Historisches	8
1.2 Epidemiologie	8
Übertragungswege und Infektionsrisiken	9
1.3 Diagnostik	9
1.4 Therapie	9
1.5 Histopathologie	10
1.6 Abwehrmechanismen gegen <i>Helicobacter pylori</i>	11
1.6.1 Immunologische Reaktionstypen	11
1.6.2 <i>Helicobacter pylori</i> und das angeborene Immunsystem	12
1.6.3 <i>Helicobacter pylori</i> und das erworbene Immunsystem	12
1.7 Impfansätze gegen die <i>Helicobacter pylori</i> -Infektion	15
1.8 Zielsetzung	16
2 PROBANDEN, MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 Ablauf der Studie	17
2.1.1. Prinzip	17
2.1.2. Probanden	17
2.1.3. Studiendesign	17
2.1.4. Studieninterventionen	18
Screening	18
Impfung	18
Belastungsinfektion	19
Probenentnahmen und Analysen	19
Eradikation und Nachsorge	19
2.2 Material	20
2.2.1 Puffer, Lösungen und Medien	20

2.2.2 Reagenzien	21
2.3 Methoden	21
2.3.1 Messung von Zytokin-Konzentrationen	21
Generierung von Biopsieüberständen	21
Bestimmung der Zytokine in Biopsieüberständen	21
2.3.2 Immunhistochemie.....	22
Vorbereitung der Biopsate für die Immunhistochemie	22
Vorbehandlung der Schnitte	23
Entparaffinisierung	23
Antigen-Demaskierung.....	23
FOXP3 Färbung.....	23
Auswertung der Färbungen.....	24
2.4 Statistik	24
3 ERGEBNISSE.....	25
3.1 Konzentration der Zytokine in Biopsieüberständen	25
3.1.1 Nachweis von Interferon (INF) γ in Biopsieüberständen	25
3.1.2 Nachweis von TNF α in Biopsieüberständen.....	29
3.1.3 Nachweis von IL-4 in Biopsieüberständen	32
3.1.4 Nachweis von IL-10 in Biopsieüberständen.....	35
3.2 Die Anzahl der FOXP3+ T _{reg} Zellen in Biopsien	38
3.3 Histopathologische Befunde	41
3.4 <i>Helicobacter pylori</i> - Nachweis	45
3.5 Vergleich <i>H. pylori</i> negativen vs. <i>H. pylori</i> positiven Probanden	48
3.5.1 Vergleich der Zytokinsekretion zwischen <i>H. pylori</i> negativen und positiven Probanden.....	49
3.5.2 Vergleich der Anzahl der FOXP3+ T _{reg} Zellen in Biopsien zwischen den <i>H. pylori</i> negativen und positiven Probanden	53
3.5.3 Vergleich der histopathologischen Befunde zwischen den <i>H. pylori</i> negativen und positiven Probanden (Extern erhobene Befunde)	57
3.6 Darstellung einzelner <i>H. pylori</i> negativer Probanden	58
3.6.1 Vergleich der Zytokinsekretion in Biopsieüberständen zwischen den <i>H. pylori</i> positiven und einzelnen <i>H. pylori</i> negativen Probanden	59
3.6.2 Vergleich der Anzahl der FOXP3+ Zellen von <i>H. pylori</i> negativen und positiven Probanden	63

3.6.3 Vergleich der Histopathologischen Befunde von <i>H. pylori</i> negativen und positiven Probanden (extern erhobene Befunde)	64
4 DISKUSSION	66
4.1 Zytokine	66
4.2 FOXP3 – exprimierende T_{reg}	69
4.3 Histopathologische Befunde	70
4.4 Vergleich der <i>H. pylori</i> positiven vs. <i>H. pylori</i> negativen Probanden	72
4.5 Schlussfolgerung	74
5 LITERATURVERZEICHNIS	76
6 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	89
7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	93
8 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	96
9 ANTEILSERKLÄHRUNG AN DER ERFOLGTEN PUBLIKATION	97
10 PUBLIKATIONSLISTE	98
11 LEBENSLAUF	99
12 DANKSAGUNG	100

ABSTRAKT

Einleitung: Die Infektion mit dem magensaftresistenten Bakterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) ist bis heute eine der wichtigsten Ursachen für Gastritiden und gastroduodenale Ulzera und stellt einen bedeutenden Risikofaktor für das Magenkarzinom dar. Angesichts der Zunahme von Antibiotika-Resistenzen wäre die Entwicklung einer zuverlässigen Impfung gegen *H. pylori* ein entscheidender Fortschritt in der Prophylaxe gastrointestinaler Erkrankungen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war im Rahmen einer Impfstudie gegen *Helicobacter pylori*, in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut (MPI) für Infektionsbiologie Berlin und der Charité-Universitätsmedizin Berlin, die Rolle der natürlichen Forkhead-Box-Protein P3 (FOXP3) exprimierenden regulatorischen T-Lymphozyten (T_{reg}) in der Mukosa von Antrum und Duodenum für den Schutz vor einer *H. pylori*-Persistenz sowie für die Immunmodulation während einer Infektion zu untersuchen. Zudem sollte das Zytokinmuster der antiinflammatorischen Zytokine Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-10 (IL-10) sowie des immunmodulatorischen Zytokins Interferon- γ ($INF\gamma$) und des proinflammatorischen Zytokins Tumornekrosefaktor- α ($TNF\alpha$) im Verlauf der Infektion aufgezeigt werden.

Methoden: 43 gesunde *H. pylori* negative Probanden wurden randomisiert und in drei Gruppen eingeteilt. Untersucht wurden der *H. pylori* Urease A/B exprimierende Impfstoff (DB2) bei 11 Probanden, der ein *H. pylori* spezifisches Antigen HP231 exprimierende Impfstoff (DB4) bei 11 Probanden und eine Kontrollgruppe mit 21 Probanden, welche nur Adjuvans, Typhoral® L, eine orale Vaccine gegen Typhus, erhielten. Alle Probanden erhielten sechs Wochen nach der Impfung eine Dosis von 10^5 Bakterien des Challenge-Stammes (*H. pylori* Baylor Stamm). Die histopathologischen Befunde der Antrum- und Duodenum-Schleimhautbiopsien wurden vor und während der Infektion aufgezeigt.

Mittels Immunhistochemie wurde die Expression der FOXP3⁺ T_{reg} in den Antrum- und Duodenum-Biopsien untersucht. Die Bestimmung der Zytokine ($INF\gamma$, $TNF\alpha$, IL-4 und IL-10) aus den Biopsieüberständen erfolgte mittels Multiplex-Analysen mit den *Cytometric bead array* (CBA) gefolgt von Analyse mittels Durchflusszytometrie.

Ergebnisse: Von 43 Probanden gelang insgesamt 9,3% (4 Probanden) die Infektion zu eradizieren. Davon war ein Proband aus der Gruppe DB4; drei Probanden waren aus der Kontrollgruppe. Für die FOXP3⁺ T_{reg} sowie für die sezernierten Mengen aller vier Zytokine ($INF\gamma$, $TNF\alpha$, IL-4 und IL-10) ergaben sich im Verlauf der Infektion keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den

beiden Impfgruppen und der Kontrollgruppe. Die Eradizierer wiesen jedoch ein moderat von den Nicht-Eradizierern abweichendes Zytokin- und FOXP3-Muster auf.

Schlussfolgerung: Die Impfstoffe DB2 und DB4 hatten keinen protektiven Einfluss auf die *H. pylori*-Infektion. Anhand der Ergebnisse ist nicht hinreichend möglich zu beurteilen, auf welche Weise es den Eradizierern gelang, die Infektion zu bekämpfen. Jedoch wird die Hypothese, dass eine erfolgreiche Eradikation mit einer Unterstützung der Th1-Antwort zusammenhängen müsse, bestätigt.

ABSTRACT

Introduction: Infection with the bacterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is still one of the leading causes of gastritis and gastro-duodenal ulcer and predisposes to risk for gastric cancer. Considering the increasing prevalence of resistance to antibiotics, the development of a reliable vaccine against *H. pylori* infections would constitute a major advance in the prevention of gastrointestinal illnesses.

The objective of this work, which was carried out as part of a collaborative *Helicobacter pylori* vaccine study of the Max Planck Institute (MPI) for Infection Biology in Berlin and the Charité University Medicine Berlin, was to identify and characterize the role of forkhead box protein P3 (FOXP3)-expressing regulatory T lymphocytes (T_{reg}) in the antral and duodenal mucosa in the protection against *H. pylori* persistence and in the immunomodulation during infection. The work includes the analysis of expression patterns of anti-inflammatory cytokines interleukin-4 (IL-4) and interleukin-10 (IL-10), of the immunomodulatory cytokine interferon- γ (INF γ), and of the pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor α (TNF α) during the course of an infection.

Methods: 43 healthy *H. pylori*-negative participants were randomly assigned to three groups. Eleven participants received the *H. pylori* Urease A/B vaccine (DB2), another 11 participants received a vaccine with the *H. pylori*-spezific antigen HP231 (DB4), and a control group of 21 participants received the adjuvant only (Typhoral® L, an oral typhoid vaccine). All participants received a dosis of 10⁵ bacteria of the *H. pylori* Baylor strain six weeks after vaccination. Histopathological examinations of the antral and duodenal mucosa biopsies were performed before and during the infection.

Expression of FOXP3⁺ T_{reg} in the antrum and duodenum was assessed with immunohistochemistry. Cytokine concentrations (INF γ , TNF α , IL-4 und IL-10) in the biopsy supernatants were measured via multiplex analyses using the *Cytometric bead array* (CBA), followed by flow cytometry.

Results: Four of the 43 (9.3%) eradicated the infection (one participant from the DB4 group and three participants from the control group). There were no significant between-group differences

regarding either FOXP3+ T_{reg} or cytokine levels (INF γ , TNF α , IL-4 und IL-10) during the course of the infection. Participants successfully eradicating *H. pylori* exhibited, however, moderate alterations of cytokine and FOXP3 patterns.

Conclusion: The DB2 and DB4 vaccines had no protective influence on *H. pylori* infection. The present results do not provide sufficient information with respect to a potential mechanism underlying *H. pylori* eradication. The study nevertheless provides further support for the hypothesis that successful eradication involves the Th1 immune response.

1 Einleitung

1.1 Historisches

Unabhängig voneinander beschrieben bereits im Jahre 1893 der italienische Arzt, Giulio Bizzozero, und im Jahre 1906 der deutsche Arzt, Walter Krienitz, Bakterienwachstum im Magen [1, 2].

Jedoch galt lange die dogmatische Leitlinie, dass im sauren Milieu des Magens kein Wachstum der Bakterien möglich ist.

Wieder entdeckt wurde dieses Magenbakterium in den Magenbiopsien der Patienten von dem australischen Pathologen Robin Warren 1979. Die Kultivierung der Bakterien gelang dem Pathologen jedoch erst 1982 [3].

Dem australischen Mikrobiologen Marshall gelang es im Selbstversuch, nach oraler Aufnahme der aus den Magenbiopsien der Patienten kultivierten Bakterien, eine Gastritis auszulösen, den Erreger aus dem eigenen Magenbiopsat zu kultivieren und die Gastritis mit Metronidazol und mit einem Bismut-Präparat erfolgreich zu therapieren bzw. die Bakterien zu eradizieren; mit diesem Selbstversuch war bewiesen, dass eine Magenbesiedlung mit diesen Bakterien eine Gastritis zur Folge haben kann [4].

Robin Warren und Barry Marshall wurden 2005 für die Entdeckung von *Helicobacter pylori* mit dem Nobelpreis für Physiologie/Medizin ausgezeichnet [5].

Helicobacter pylori (*H. pylori*) ist ein obligat pathogenes spirales gramnegatives Bakterium, das bei der Hälfte der Weltbevölkerung die Schleimhaut des Magens und Duodenums kolonisiert und die Ursache der chronisch-aktiven Gastritis, verantwortlich für die meisten Ulzera von Gastrum und Duodenum (peptisches Ulkus), ein Co-Faktor bei der Entwicklung des Magenkarzinoms ist [6] und laut WHO seit 1994 als Klasse-I-Karzinogen gilt [7]. Überdies wird in letzter Zeit intensiver über die Rolle von *H. pylori* bei der Entwicklung der neurodegenerativen Erkrankungen und der metabolischen Syndromen diskutiert [8].

1.2 Epidemiologie

Etwa die Hälfte der Weltbevölkerung ist mit *H. pylori* infiziert. Aufgrund des genetischen Polymorphismus von *H. pylori* ist anzunehmen, dass der moderne Mensch seit Anbeginn seiner Existenz mit diesem Erreger infiziert ist [9]. Die Infektionen werden in der Regel bereits in der frühen Kindheit erworben und persistieren ohne therapeutische Intervention meistens lebenslang [10].

Die Infektionsrate hat in den vergangenen Jahrzehnten stark abgenommen. In Industrieländern ist die Prävalenz mit 20 bis 50 % deutlich niedriger als in Entwicklungsländern, wo meist der überwiegende Teil der Bevölkerung, bis zu 80%, infiziert ist [11].

In Deutschland ergaben zwei größere Studien mit 945 und 540 Schulkindern eine Prävalenz von 9 bis 13 % [12; 13]. Bei den Erwachsenen liegt die *H. pylori*-Prävalenz bei etwa 20 bis 30 % [14].

Übertragungswege und Infektionsrisiken

Die bisher bekannten Wirte von *H. pylori* sind der Mensch und einige nicht menschliche Primaten [15]. Der Übertragungsweg der Infektion ist jedoch noch nicht sicher geklärt. Es scheint plausibel, dass in Entwicklungsländern, aufgrund mangelhafter hygienischer Bedingungen, der fäkal-orale Übertragungsweg dominiert; in den Industrieländern hingegen soll der bevorzugte Modus der Übertragung der gastro-orale Weg sein [16, 17].

Andere Übertragungswege, wie durch Hausfliegen, Hunde, Katzen oder Lebensmittel, haben sich als eher unwahrscheinlich herausgestellt [18; 19]. Jedoch wurde *H. pylori* in seltenen Fällen von Haustieren isoliert, so dass deren Anwesenheit ein Risikofaktor für die Infektion sein könnte [20].

1.3 Diagnostik

Zur Diagnostik einer *H. pylori*-Infektion wurden mehrere Testverfahren entwickelt, die eine Sensitivität und Spezifität von über 90 % erreichen. Zu den invasiven Tests, deren Grundlage die Biopsie des Magens bzw. Duodenums ist, gehört die Histologie und die Kultur. Es besteht allerdings auch die Möglichkeit das Biopsat mittels Urease-Schnelltest (HUT – Helicobacter Urease Test/URT – *Urease rapid test*) binnen kürzester Zeit zu überprüfen [21].

Zu den nicht-invasiven Methoden gehört der ¹³C-Harnstoff-Atemtest, mit welchem der Erreger indirekt nachgewiesen wird. Hierzu gehören auch alle Antigentests, die mit Stuhl-, Urin- oder Speichelproben durchgeführt werden können. Des Weiteren besteht noch die Möglichkeit, das Serum auf Antikörper gegen *H. pylori* zu untersuchen, wobei diese Methode meist nur bei großen epidemiologischen Untersuchungen genutzt wird [22]. Für klinische Fragestellungen werden meist Histologie, Kultur und ¹³C-Harnstoff-Atemtest angewandt [23].

1.4 Therapie

Sofern die *H. pylori*-Infektion klinisch ohne Beschwerden bleibt, ist eine Behandlung in der Regel nicht erforderlich, es sei denn, dass zum Beispiel anamnestisch ein erhöhtes Magenkarzinomrisiko

vorliegt. In jedem Falle angezeigt ist eine Behandlung jedoch immer dann, wenn Ulzera von Magen oder Duodenum vorliegen [21].

Als Therapie der ersten Wahl wird die sog. Tripeltherapie empfohlen. Diese umfasst die Behandlung mit einem Protonenpumpenhemmer (PPI) sowie den beiden Antibiotika: Clarithromycin (2x500mg) und Metronidazol (2x400mg) (Italienische Tripeltherapie). Anstelle von Metronidazol ist auch der Einsatz von Amoxicillin (2x1000mg) möglich (Französische Tripeltherapie). Bei Therapieversagern kommen als Alternativen Ciprofloxacin, Rifabutin, Tetracyclin oder Bismut-Präparate in Frage [21, 24, 25, 26].

Die *H. pylori* - Eradikationsrate nimmt aufgrund der Antibiotika-Resistenz in den letzten Jahren konstant ab. Beispielweise sind nach Selgrad et al. (2013) in Mitteldeutschland die primäre, sekundäre und tertiäre *H. pylori* - Resistenzrate von Clarithromycin, Levofloxazin und Metronidazol bis zu 80%. Dagegen zeigen Tetracycline und Rifabutin mit <5% komparativ niedrigere Resistenzraten und Amoxicillin-Resistenz wurde nicht beobachtet; entsprechend empfiehlt sich in Mitteldeutschland die Französische Tripeltherapie anzuwenden [27]. Alternativ können künftig die Bismut-basierte Quadrupeltherapie (PPI, Bismut, Metronidazol, Tetracyclin) oder die konkomitierende Vierfachtherapie (PPI, Clarithromycin, Amoxicillin, Metronidazol) zur Anwendung kommen [28].

1.5 Histopathologie

Die initiale Besiedlung der Magenschleimhaut durch *H. pylori* führt regelmäßig aufgrund bakterieller Faktoren und Wirtskomponenten zu einer akuten Entzündungsreaktion. Zu den wichtigsten bakteriellen Pathogenitäts- bzw. Virulenzfaktoren zählen Flagellen, die der Fortbewegung dienen [29, 30], Adhäsine, die die entscheidende Rolle beim Anheften der Bakterien an die Epithelzellen spielen und damit für die Induktion einer Entzündungskaskade maßgeblich sind [31], Urease – ein Harnstoff in Ammoniak und CO₂ spaltendes und damit pH-neutralisierendes Enzym, *cagA* (*cytotoxin-associated gene A*) – ein hochgradig immunogenes Antigen, *vacA* (*vacuolating toxin A*) – ein Epithelzellen schädigendes Toxin, LPS (Lipopolysaccharide) – eine Oberflächenstruktur des Bakteriums und *cagPAI* (*cag-Pathogenitätsinsel*), die das *cagA* in die Zellen einschleust [32, 33, 34, 35]; *OipA* (*Outer Membran Inflammatory Protein*) und *BabA* (*blood-group-antigen-binding adhesine*) sind ebenfalls Adhäsine, die die Vermehrung proinflammatorischer Zytokine, wie IL-8, und damit die neutrophyle Infiltration in die Mukosa verursachen [36, 37]. Auf der Seite des Wirts sind sowohl die genetische Prädisposition als auch der Lebensstil bedeutsam [38].

Die akute Entzündung geht im Anschluss bei fast allen Infizierten in eine chronische Gastritis über, die in der Regel lebenslang persistiert, sofern sie nicht behandelt wird [16; 39].

Typisches Merkmal der chronischen Entzündungsreaktion ist die Infiltration der Magenschleimhaut mit neutrophilen Granulozyten, T- und B-Lymphozyten und Monozyten. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von einer chronisch-aktiven Gastritis. Primär bedingt ist diese durch die Anheftung der Bakterien an die Zellen der oberflächlichen Magenschleimhautzellschicht, die zunächst eine Interleukin-(IL)-8-Produktion durch die Epithelzellen auslöst, was dann wiederum ein Signal für den starken Granulozyteneinstrom in die Submukosa ist. Es folgt die Expression weiterer Zytokine, wie IL-1 β , IL-2, IL-6 und Tumornekrosefaktor (TNF) α . Schließlich wandern auch Plasmazellen, Makrophagen und B-Lymphozyten ein [24].

Das Ausmaß der Mukosa-Schädigung korreliert stark mit dem Ausmaß der neutrophilen Infiltration. Diese hat einen direkten toxischen Effekt auf die Epithelzellen, da sie eine Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen und Proteasen induziert. Die Sauerstoffradikale können dann DNA-Schädigungen verursachen, was wiederum eine maligne Entartung der Zellen zur Folge haben kann [40].

Bei etwa der Hälfte der Patienten geht die chronisch-aktive Gastritis in eine atrophische Gastritis über. Diese Form prädisponiert zum Magenulkus, zu Metaplasien und zum Magenkarzinom. Das Duodenalulkus tritt im Zusammenhang mit der atrophischen Gastritis kaum auf, sondern kommt vorwiegend bei der chronisch-aktiven Gastritis vor. Umgekehrt sind Magenulkus, Metaplasien und Karzinome bei der chronisch-aktiven Form selten [41]. Man schätzt, dass das Risiko von *H. pylori*-positiven Individuen, im Laufe des Lebens eine Ulkuserkrankung zu entwickeln, bei etwa 10 bis 20 Prozent liegt. Das Risiko für die Entwicklung eines Magenkarzinoms liegt bei etwa 1 bis 2 Prozent [42, 43]. Das Risiko aller *H. pylori*-positiven Individuen ein Magenkarzinom zu entwickeln ist insgesamt etwa 10-fach erhöht. Weniger als 1 Prozent der *H. pylori*-positiven Individuen weisen als Komplikation ein MALT- (Mucosa Associated Lymphoid Tissue) Lymphom auf [44]. Allerdings liegt in fast allen Fällen, in denen ein MALT-Lymphom diagnostiziert wird, eine *H. pylori*-Infektion vor, so dass das Bakterium als Hauptursache betrachtet werden kann [45, 46].

1.6 Abwehrmechanismen gegen *Helicobacter pylori*

1.6.1 Immunologische Reaktionstypen

Im Rahmen der Erregerabwehr wird hinsichtlich der T-Helferzellen (Th-Zellen) -Reaktion zwischen der Th1- und der Th2- Antwort unterschieden. Vereinfacht betrachtet geht man davon aus, dass die Th1-Antwort der Abwehr von intrazellulären Pathogenen dient. Die Th2-Antwort hingegen dient der Abwehr von extrazellulären Pathogenen und induziert dabei die humorale Abwehr, es wird die Produktion von Antikörpern durch B-Lymphozyten stimuliert. Inzwischen wurden weitere Differenzie-

rungen der Th-Zellen entdeckt, wie Th17-Zellen, die auch eine wichtige Rolle in der proinflammatorischen Immunantwort auf *H. pylori*-Infektion spielen und ROR γ (*Retinoid-like Orphan Receptor*), IL-17, TNF α , GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) und IL-6 koexprimieren; *H. pylori* induziert die Th17 Zell-Differenzierung via infizierte Makrophagen [47].

1.6.2 *Helicobacter pylori* und das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem stellt die erste Abwehr des Organismus gegen die eindringenden Mikroorganismen dar. Dieser Abwehrmechanismus basiert auf der Erkennung des Pathogen-assoziierten molekularen-Musters/(patterns“) (PAMP) der Zelloberfläche der Bakterien durch die diversen *Pattern-Recognition Receptors* (PRRs), die sich an den Zellen des angeborenen Immunsystems befinden. Wichtige Vertreter der PAMPs sind die LPS der Zellwand der Bakterien. Eine Untergruppe der PRRs stellen die TLRs (*Toll-like-Receptors*) dar, die in der Regel eine wichtige Rolle in der Induktion einer Entzündungsreaktion spielen [48].

Eine exzessive Aktivierung der antimikrobiellen Mechanismen scheint entscheidend für die Eliminierung des Pathogens zu sein [49]. Die LPS von *H. pylori* scheinen jedoch signifikant niedrigpotent zu sein um über die TLR4 eine zur Pathogen-Eliminierung ausreichende proinflammatorische Reaktion zu induzieren [48]. Ähnlich signifikant niedrigpotent zur Aktivierung von IL-8 – Sekretion scheinen auch die Flagellen, so dass *H. pylori* über die TLR5 vermittelten Flagellen-Erkennung entkommt, was zur Erregerpersistenz beitragen kann [50].

1.6.3 *Helicobacter pylori* und das erworbene Immunsystem

Bekanntermaßen gelingt es dem Erreger *H. pylori* in den meisten Fällen, der effektiven Immunabwehr zu entgehen. Es wurden mehrere Mechanismen vermutet, die es *H. pylori* ermöglichen, die Immunabwehr zu umgehen, beispielsweise über *vacA*: *H. pylori vacA* blockiert die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen hauptsächlich durch einen Eingriff in den IL-2 Signalweg [51]. Ein weiterer Faktor, der die effektive Eliminierung des Pathogens behindert, ist die Suppression der Memory-T-Zell-Antwort durch die *H. pylori* spezifischen regulatorischen T-Lymphozyten (T_{reg}) [52]. T_{reg} unterdrücken die inflammatorische Reaktion bedingt durch IL-17, wodurch auch bakterielle Persistenz begünstigt wird. Insgesamt scheint IL-17 eine duale Rolle bei Infektion und Vaccination zu spielen: Einerseits durch den o.g. Mechanismus trägt IL-17 zu der bakteriellen Persistenz bei und andererseits produziert die Immunisierung *Helicobacter*-spezifische Memory-Th-Zellen, die möglicherweise das Verhältnis zwischen Th17- und T_{reg}-Antworten modulieren können, so dass die IL-17 vermittelte

inflammatorische Reaktion die T_{reg} -Antwort überwinden kann, was zur bakteriellen Clearance führt [53].

In der Regel ist ein höher Antikörper- (AK)-Titer (IgA-, IgM- und IgG- Isotypen) gegen *H. pylori* bei infizierten Individuen vorhanden. Jedoch begünstigen sie im Gegensatz zu den anderen antimikrobiellen AK die Persistenz der Infektion [54]. Studien in Mausmodellen haben gezeigt, dass B-Lymphozyten-Aktivierung bei der *H. pylori*-Infektion zu einer Erhöhung der Zahl der IL-10 (ein antiinflammatorisches Zytokin) produzierenden T_{reg} führt [55].

In den Magenbiopsien von *H. pylori* infizierten Patienten liegt eine erhöhte Konzentration von $IFN\gamma$ vor [56-58]. Antigen-spezifische Th1-Zellen fördern die proinflammatorische zellvermittelte Immunität durch die Produktion von in erster Linie $IFN\gamma$ [59]. Ferner geht die Aktivierung dieser Th1-Zellen mit der Produktion von weiteren proinflammatorischen Zytokinen wie $TNF\alpha$, IL-12, IL-18, und IL-17 in der Magenschleimhaut einher [57, 60]. Bei *H. pylori* positiven Patienten mit Gastritis war $TNF\alpha$ -Expression im Vergleich zu Kontrollpersonen um den Faktor 3 erhöht [61].

Aufgrund des extrazellulären Vorkommens von *H. pylori* in der Magenschleimhaut wäre anzunehmen, dass vordergründig eine Th2-Antwort und die humorale Abwehr mittels IgA-AK bei der Abwehr eine tragende Rolle spielen. Die Th2-Antwort scheint aber nur eine untergeordnete Rolle zu spielen: Im Mausmodell sind weder IL-4 (typisch für eine Th2-Antwort) noch eine AK-Produktion notwendig, um eine Protektion gegenüber der Infektion zu erreichen [62, 63]. Bei B-Zell-defizienten IgA-Knockout-Mäusen gelingt nach Immunisierung ein vollständiger Schutz gegen *H. pylori* [64-66].

In vielen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass die zellvermittelte Th1-Antwort und die unspezifische Immunität die wesentlichen Faktoren bei der *H. pylori*-Infektion sind [59, 67-69], da die *H. pylori*-Infektion eine Infiltration mit Neutrophilen und $CD4^+$ T-Zellen sowie die erhöhte Sekretion von proinflammatorischen $TNF\alpha$ und $IFN\gamma$ verursacht [61, 70].

Wirksame immunologische Antworten sind manchmal mit einer starken Entzündungsreaktion verbunden. Um die Selbstbeschädigung des eigenen Organismus möglichst gering zu halten, wird bei der Aktivierung des Immunsystems gleichzeitig auch ein antientzündlicher Prozess aktiviert [71]. Bei der aktiven antiinflammatorischen Reaktion spielen bestimmte Zytokine, wie zum Beispiel IL-10, sowie T_{reg} -Zellen eine tragende Rolle [72].

Für die Entwicklung und die Funktion von natürlichen T_{reg} ist das *Forkhead-Box-Protein P3* (*Foxp3*)-Gen (beim Menschen *FOXP3*) ein regulatorisches Schlüssel-Gen [73-75] und wird als geeigneter Marker zur Identifizierung von $CD4^+ CD25^+ T_{reg}$ betrachtet [73-78]. Das FOXP3-Protein ist ein Transkriptionsfaktor, der spezifisch in T_{reg} exprimiert wird und als molekularer Marker dieser Zellpopulation dient [73, 74].

Neben diesen natürlichen T_{reg} , gibt es auch T_{reg} , die erst durch Antigen-Stimulation und unter dem Einfluss von Zytokinen gebildet werden [79, 80]. Diese T_{reg} lassen sich in die T_{r1} (T regulatory 1) - Zellen, welche IL-10 exprimieren (IL-10- T_{reg}) und die Th3-Zellen, welche durch die Sekretion des *Transforming growth factor* (TGF)- β 1 gekennzeichnet sind (TGF- β - T_{reg}), einteilen [78]. Die Antigen-gesteuerten T_{reg} produzieren, anders als die natürlichen T_{reg} , kein FOXP3. Außerdem können sowohl die T_{r1} - als auch die Th3-Zellen von den natürlichen T_{reg} unabhängig proliferieren [81].

Aufgrund zahlreicher Untersuchungen wird immer deutlicher, dass den T_{reg} eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Immunantworten zukommt [67, 68, 72, 82-84].

Im Zusammenhang mit einer *H. pylori*-Infektion zeigte sich, dass T_{reg} auch hier eine wichtige Rolle spielen [83, 85, 86]: Sie schützen vor Schädigungen, die während der Immunantwort bzw. der Abwehr an körpereigenen Zellen entstehen können. Dadurch werden dann zwar pathologische Veränderungen, etwa Schleimhautschädigungen, tatsächlich verhindert oder abgeschwächt, jedoch profitiert auch der Erreger von dieser Immunsuppression. In Folge dessen gelingt es *H. pylori* in den meisten Fällen, der effektiven Immunabwehr zu entgehen, was in eine chronische Infektion mündet [68, 87].

IL-10 ist das klassische anti-inflammatorische Zytokin der regulatorischen T-Zellen, das Th1-Zellen, NK-Zellen (Natürliche Killer-Zellen) und Makrophagen inhibiert um die Gewebsschädigungen, die während einer Infektion bzw. deren Abwehr entstehen, möglichst gering zu halten [88]. IL-10 wird von IL-10- T_{reg} (T_{r1} -Zellen), aber auch von natürlichen T_{reg} sowie von B-Lymphozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen oder anderen T-Zellen ($CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen) produziert [72, 88, 89]. IL-10 inhibiert auf indirektem Weg die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 und TNF α und von Chemokinen wie zum Beispiel IL-8. Durch einen direkten Einfluss auf $CD4^+$ T-Zellen kann IL-10 die Produktion von IL-2, IL-4, IL-5, INF γ und TNF α inhibieren. IL-10 kann die Th1- und die Th2-Antworten regulieren, dadurch dass die T-Zell-Aktivierung und -Differenzierung in den Lymphknoten limitiert wird. Störungen der IL-10-Kontrolle können zu schwerwiegenden und oft fatalen immunpathologischen Schädigungen führen [72, 88].

IL-10, das ebenfalls stark in der *H. pylori* infizierten gastralen Mukosa exprimiert wird [90], ist eines der wichtigsten regulatorischen Zytokine, welches die zellvermittelte Immunantwort inhibiert [91]

bzw. moduliert [90]; IL-10 dürfte mitverantwortlich dafür sein, dass eine natürliche Eradikation des Pathogens überwiegend nicht gelingt. Dieses Konzept wird unter anderem durch die Beobachtung untermauert, dass sich bei *H. pylori* infizierten IL-10-Knockout-Mäusen eine viel schwerwiegendere chronisch aktive Gastritis entwickelt; des Weiteren wurde in der selben Studie von Chen et al. im Serum der IL-10-defizienten Mäuse eine signifikant höhere *H. pylori* spezifische IgA- und IgG-AK-Konzentration beobachtet [92].

Wie IL-10 inhibiert auch das Zytokin IL-4 (IL-4 ist ein typisches Th2-Zytokin, das auch von Makrophagen gebildet wird) die Th1-Antwort über eine Vielzahl von Mechanismen [72]. Die für IL-10 angestellten Überlegungen gelten grundsätzlich auch für IL-4, da es eine proinflammatorische Th1-Antwort hemmt. Jedoch konnte bei Karttunen et al. keine erhöhte IL-4-Sekretion bzw. keine erhöhte Zellzahl der IL-4 sezernierenden Zellen bei sowohl *H. pylori* positiven als auch *H. pylori* negativen Gastritis nachgewiesen werden [56].

1.7 Impfansätze gegen die *Helicobacter pylori*-Infektion

Die aktuelle Antibiotika-Therapie gegen die *H. pylori* Infektion hat viele Nachteile einschließlich Therapieversagen aufgrund der Resistenzentwicklung, mangelnder Compliance der Patienten, hoher Kosten der Behandlung und Re-Infektionen [26, 27]. Aufgrund dessen wäre die Entwicklung einer Vaccine gegen *H. pylori* der entscheidende Beitrag zur Prophylaxe gastrointestinaler Erkrankungen. Die Studien in Tiermodellen mit verschiedenen Antigen-Adjuvans Kombinationen sind für die Entwicklung einer prophylaktischen oder therapeutischen Vaccine Erfolg versprechend [93-99]. Eine prophylaktische Vaccine wäre vor allem bei kleinen Kindern in endemischen Gebieten nützlich [100]. Die therapeutische Vaccine wäre ein sinnvoller alternativer oder ergänzender Ansatz bei der Behandlung bereits infizierter Menschen. Hinsichtlich beider Strategien konnten in Tierversuchen für *H. pylori* vielversprechende Ergebnisse erzielt werden. Es konnte gezeigt werden, dass durch einen geeigneten Impfstoff, beispielsweise etwa mit einem Lipoprotein (LPP20) und Cholera Holotoxin [98], mit Urease als Antigen und Choleratoxin als Vektor [99], mit HpaA (*H. pylori* spezifisches LPP) und UreB (Urease B) in Kombination [94] oder mit rekombinantem *Mycobacterium smegmatis* [93] die bakterielle Last deutlich reduziert werden kann. Es gelang auch teilweise eine vollständige Protektion gegenüber dem Erreger zu erreichen; es war sogar möglich, bei bereits bestehender Infektion, den Erreger komplett zu beseitigen [97, 98, 101].

Studien an Knockout-Mäusen zeigten, dass trotz Fehlen der Th2-Antwort die Immunisierung immer noch möglich ist, wenn Urease als Antigen verwendet wird [66]. Diese Experimente unterstreichen die entscheidende Rolle von Th1-Zellen in der Impfstoffentwicklung und auf der Basis dieser Er-

kenntnisse wurde von Prinz et al. 2003 die Hypothese aufgestellt, dass ein Impfstoff entwickelt werden müsse bzw. ein Adjuvans einzusetzen sei, welches die Th1-Antwort verstärken würde [33]. Entsprechend zeigte sich beim Vergleich einer Th1- mit einer Th2-unterstützenden Vaccine im Mausmodell, dass nur mit der Th1-Vaccine eine Protektion erreicht werden konnte [102].

Bisher sind alle Bemühungen, eine wirksame Immunisierung beim Menschen zu erreichen, nicht erfolgreich gewesen. Dies liegt zum Teil daran, dass die wesentlichen immunologischen Mechanismen der protektiven Immunität gegenüber *H. pylori* nicht vollständig geklärt sind. Zum Teil ist aber auch noch nicht bekannt, welche Antigenstrukturen oder welcher Antigenmix für eine optimale Immunreaktion notwendig ist [103]. Mit den im Tierversuch erfolgreichen Antigenen, etwa mit Urease als Antigen und hitzelabilem *E. coli*-Enterotoxin als Vektor [104] oder mit einem Impfstoff aus inaktivierten *H. pylori*-Bakterien, sowohl mit als auch ohne Vektor (wiederum hitzelabiles *E. coli*-Enterotoxin), konnte bisher keine signifikante Protektion im Menschen erzielt werden [105]. Ein zuletzt untersuchter prophylaktischer konjugierter Impfstoff, der auf chemisch modulierten *H. pylori* -LPS basiert, provozierte zwar eine verstärkte AK-Reaktion, führte jedoch nur zu einer bescheidenen Reduzierung der *H. pylori*-Last im Magen [106]. Des Weiteren wurde ein oraler Impfstoff mit rekombinanten, *H. pylori* Adhäsine Hp0410 exprimierenden, *Lactobacillus acidophilus* entwickelt, der eine gute humorale und lokale Immunität bei den Mäusen erzielte [107].

1.8 Zielsetzung

Aufgrund der hohen Prävalenz *H. pylori* assoziierter Erkrankungen in Entwicklungsländern und der steten Zunahme von Antibiotika-Resistenzen sind das Verständnis der immunologischen Infektionsmechanismen und die Entwicklung einer effektiven Vaccine dringend erforderlich.

Das Hauptproblem des bisherigen Misserfolgs der *H. pylori*-Vaccine für den Menschen besteht darin, dass es nicht hinreichend gelingt, die für die Erregerabwehr notwendigen Immunmechanismen zu induzieren.

Eine wichtige Rolle spielt weiterhin das Verhältnis der durch den Impfstoff induzierten Th1- zur Th2-Antwort. Die Th1-Antwort wird durch *H. pylori* supprimiert, wobei T_{reg} eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen. Wenn es gelänge, die Zahl der FOXP3+ T_{reg} zu reduzieren, so müsste durch eine damit verstärkte Th1-Antwort die Eliminierung des Erregers möglich sein, zumindest jedoch die bakterielle Last reduziert werden können. Sofern es also im Rahmen dieser Studie zu einer Clearance der Infektion kommen sollte, so wäre zu erwarten, dass bei solchen Probanden auch die Zahl der natürlichen T_{reg} reduziert wäre. Es wäre ferner zu erwarten, dass die beiden immunsupp-

ressiven Zytokine IL-4 und IL-10, welche die Th2-Antwort charakterisieren, ebenfalls vermindert wären.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der sog. natürlichen T_{reg} (FOXP3⁺ T_{reg} oder CD4⁺CD25⁺ T_{reg}) in der Mukosa von Antrum und Duodenum für den Schutz vor einer *H. pylori* - Persistenz sowie für die Immunmodulation während einer Infektion zu untersuchen. Des Weiteren sollte das Zytokinmuster der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IFN γ sowie der supprimierenden Zytokine IL-4 und IL-10 im Verlauf der Infektion aufgezeigt werden.

Als Arbeitshypothese wurde davon ausgegangen, dass eine erhöhte Aktivität von T_{reg} und die vermehrte Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen (z.B. IL-10) die Persistenz von *H. pylori* erleichtern könnten.

2 Probanden, Material und Methoden

2.1 Ablauf der Studie

2.1.1. Prinzip

Es sollte die Wirksamkeit des Impfstoffes für eine Immunisierung gegen *H. pylori* untersucht werden. Als Adjuvans diente der Salmonellenstamm Ty21a, der als oraler Lebendimpfstoff gegen Typhus eingesetzt wird und unter dem Handelsnamen Typhoral® L bekannt ist. Dazu wurden die Antigene Urease A/B (DB2) und HP0231 (DB4) in den Impfstamm eingebracht [108-110].

2.1.2. Probanden

An der Studie nahmen insgesamt 43 gesunde männliche 20 bis 50 Jahre alte *H. pylori* negative Probanden teil. Jeweils 11 Probanden wurden entweder mit dem Impfstoff DB2 oder DB4 behandelt, die übrigen 21 Probanden erhielten als Vergleichs- bzw. Placebogruppe nur das Adjuvans, den nicht gentechnisch veränderten Lebendimpfstoff, Typhoral L®.

2.1.3. Studiendesign

Bei dieser Studie handelte es sich um eine randomisierte Doppelblindstudie (randomisierter Parallelgruppenvergleich der Phase I). Die Untersuchung wurde monozentrisch durchgeführt.

Den Probanden wurde randomisiert entweder Impfstoff I (DB2), Impfstoff II (DB4) oder Placebo (Typhoral L®) verabreicht. Das Studiendesign ist veröffentlicht [110]. Sämtliche Sicherheitskontrollen und Qualitätskontrollen der Impfstämme, und die Anzucht des Impfstammes und des *H. pylori*-

Stammes für die Belastungsinfektion wurden unter zertifizierten Bedingungen am MPI (Max-Planck-Institut) für Infektionsbiologie durchgeführt [108-110].

Die Studie wurde nach den Grundsätzen der Helsinki-Deklaration von 1964 in ihrer Edinburgh 2000 revidierten Fassung durchgeführt. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Charité überprüft und zugelassen und die Studie war bei dem Paul Ehrlich Institut registriert.

2.1.4. Studieninterventionen

Screening

Nach Aufnahme eines Probanden in die Studie erfolgten eine ausführliche Anamneseerhebung und klinische Untersuchung, sowie eine Bestimmung hämatologischer (einschließlich Differenzialblutbild) und klinisch-chemischer Blutparameter. Drei Wochen vor der Impfung (Tag -21) wurde zur Einschätzung des gesundheitlichen Gesamtstatus dem Probanden Blut zur Bestimmung der HLA (*Human Leukocyte Antigen*) - Subtypen entnommen sowie eine Gastroskopie durchgeführt, bei der auch Gewebeproben (ca. 14 Biopsien) zur histologischen und immunologischen Charakterisierung entnommen wurden. Ferner wurde ein ^{13}C -Atemtest vorgenommen. Dieses Prozedere diente u. a. dem Ausschluss einer früheren *H. pylori*-Infektion.

Impfung

Die Verabreichung des Impfstoffes erfolgte an den Tagen 0, 2, 4, 5 und 7. Zur Untersuchung der Immunantwort wurde an den Tagen 7 und 28 eine Blutprobe entnommen.

Verum: Rekombinante Ty21a (pINK) oder Ty21a (p231) Vakzine. Jede Impfdosis bestand aus 10^{10} lebenden Organismen, die in 30ml einer 1,5%igen Bikarbonatlösung suspendiert waren.

Placebo: Ty21a-Vakzine. Jede Impfdosis bestand aus 10^{10} lebenden Organismen, die in 30ml einer 1,5%igen Bikarbonatlösung suspendiert waren.

In allen drei Prüfgruppen wurde der Prüfstoff als orale Suspension verabreicht. Die Impfdosis wurde jeweils nüchtern eingenommen. Nach der Einnahme verblieben die Probanden weitere 90 Minuten nüchtern.

Belastungsinfektion

Alle Probanden erhielten sechs Wochen nach der Impfung (Tag 42) eine Dosis von 10^5 Bakterien (minimal infective dosis) des Challenge-Stammes (*H. pylori* Baylor Stamm) nach dem Protokoll vorangegangener Challenge-Studien [109, 111]. Damit konnte eine zuverlässige Belastungsinfektion gesetzt werden. Die Infektion führte in allen Fällen zu einer histologisch nachweisbaren Gastritis, wie sie für eine *H. pylori*-Infektion typisch ist.

Probenentnahmen und Analysen

Die Schutzwirkung der Impfung wurde mittels Atem- und Stuhlantigentest untersucht. Dies erfolgte an den Tagen 45, 49, 56, 63, 70, 80, 94, 108 und 120.

Nach der Belastungsinfektion wurden zwei Gastroskopien durchgeführt (Tag 80 und 120). Die dabei entnommenen Biopsien dienten dabei dem Zweck, die lokale Immunreaktion zu analysieren und den Grad der Entzündung mittels Histologie zu beurteilen.

Es wurden jeweils Biopsien aus dem Antrum und dem Duodenum entnommen. In diesen Biopsaten wurden mittels Immunhistochemie die FOXP3+ T_{reg} bestimmt. Zudem wurde aus den Kulturüberständen mittels Durchflusszytometrie die Zytokinsekretion gemessen. Die hämatologischen und klinisch-chemischen Blutparameter sowie der ¹³C-Atemtest wurden nach den üblichen Methoden des Routinelabors der Charité bestimmt.

Am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in Berlin erfolgten zusätzliche Untersuchungen: Die Charakterisierung der humoralen und zellulären Immunantwort auf das Impfantigen durch *in vitro* Untersuchungen von B- und T-Lymphozyten der Probanden. Die *H. pylori*-Antikörper wurden mittels ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) und Elispot (*Enzyme Linked Immuno Spot Assay*) bestimmt. Die *H.-pylori*-Last aus der Gewebeprobe der ersten Gastroskopie nach Belastungsinfektion wurde mittels Kultur untersucht und die Expression verschiedener, für die Immunreaktion und Inflammation relevanter Gene, wurde mittels quantitativer PCR (*Polymerase Chain Reaction*) bzw. mittels Genexpressionsarrays untersucht [110].

Die Gastrum- und Duodenum-Biopsien wurden (von Prof. Dr. med. habil. Manfred Stolte Pathologie, Bayreuth) histopathologisch auf Inflammationsgrad und *H. pylori*-Besiedlung untersucht (Gastroskopien nach Belastungsinfektion).

Eradikation und Nachsorge

Die Eradikation erfolgte innerhalb von 120 bis 134 Tagen nach der Belastungsinfektion.

An den Tagen 135, 149 und 200 fand ein ¹³C-Atemtest statt, um den Erfolg der Eradikation sicherzustellen. Zum Abschluss der Studie wurde nochmals eine körperliche Untersuchung durchgeführt.

2.2 Material

Standard-Reagenzien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck und Sigma bezogen.

2.2.1 Puffer, Lösungen und Medien

PBS	10-fach Phosphat gepufferte Kochsalzlösung: 80g NaCl, 20g KCl, 14,2g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 2g K H ₂ PO ₄ auf 1000ml Aqua destillata auffüllen, auf pH 7,4 einstellen, steril filtrieren.
PBS / 4% Paraformaldehyd (PFA)	500ml PBS, 20g (2x10g) PFA entweder 70°C bei Stufe 7 rühren bis PFA sich gelöst hat oder 50°C bei Stufe 7 rühren O/N Abkühlen lassen, aliquotieren in 15ml, Lagerung bei -20°C.
PBA	PBS mit Bovinem Serumalbumin (BSA) und Acid: 1000 ml PBS 1x, 4 g BSA, 2 ml 10%NaN ₃ -Lösung , steril filtrieren
TBS	Tris- gepufferte Kochsalzlösung pH 7,4 – 7,6: 34,25g Tris HCL , 4,5g Tris – Base und 43,90g NaCl mischen und mit vollentsalztes (VE) Wasser auf 5l auffüllen, anschließend 5ml Tween dazugeben.
TBS/Tween	1l TBS mit 1ml Tween
Citratpuffer pH 6,0	10,5g Zitronensäure und 60ml 2N NaOH
DAB	3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (Sigma): 45ml voll entsalztes (VE) Wasser, 3 Wasserstoffperoxid-Tabletten (in Goldfolie), 3 DAB Tabletten (in Silberfolie) In VE Wasser erst die Hydrogen Peroxid Tabletten legen und anschließend gleich die DAB Tabletten. Parafilm auf den Erlenmeyerkolben kleben damit sich die Tabletten lösen (Gase entstehen, die benötigt werden um die Reaktion zu starten). SigmaFast; Bestellnr.: D-4418 Tablette Sets.
LPL-Medium	500ml RPMI (Roswell Park Memorial Institute Zellkultur) 1640 mit Glutamin, 12,5ml HEPES 1M, 50 ml FCS 5 ml P/S 10.000 U/ml, 5 ml Amphotericin 250 µg/ml, 0,5ml β-Mercaptoethanol 50mM

2.2.2 Reagenzien

<i>Ratte anti-human-FOXP3</i>	eBioscience, Bestellnr.: 14 – 4776 Isotype: Rat IgG2a,K
<i>Rabbit anti rat Biotin</i>	DAKO, Bestellnr.: E 0467
<i>Detektionssystem Envision</i>	DAKO ChemMate DAKOEnvision, Bestellnr.: K 52007 HRP Rabbit/Mouse
<i>Wasserstoffperoxid 30%</i>	Merck
<i>Antibody Diluent</i>	DAKOCytomation ChemMate, Bestellnr.: S 2022
<i>Hämatoxylin</i>	Meyer´s Hematoxylin 500ml DAKO S330930

¹nach Herstellerangaben

2.3 Methoden

2.3.1 Messung von Zytokin-Konzentrationen

Generierung von Biopsieüberständen

Biopsieüberstände wurden wie beschrieben generiert: Biopsien wurden in NaCl oder PBS aufbewahrt und direkt nach der Entnahme weiterverarbeitet. Das Gewicht wurde bestimmt und drei Biopsien auf Siebe in 500µl LPL-Medium in Platten mit 24 Kavitäten für 48 Stunden bei 5% CO₂ und 80% O₂ im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach Entnahme wurde der Überstand auf 500µl mit LPL Medium aufgefüllt und bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren [112].

Bestimmung der Zytokine in Biopsieüberständen

Die Bestimmung der Zytokine (INF γ , TNF α , IL-4 und IL-10) aus den Überständen erfolgte mittels Multiplex-Analysen mit den *Cytometric bead array* (CBA) unter der Verwendung von Durchflusszytometrie (mit FACS - *Fluorescence Activated Cell Sorter* von der Firma Becton Dickinson (BD)). Zu diesem Zweck kamen der BDTM CBA Human Th1/Th2 Cytokine Kit II und der CBA Kit für inflammatorische Zytokine zum Einsatz (BD Biosciences, Heidelberg). Die Messungen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Der CBA von BD Biosciences basiert auf dem Prinzip des Sandwich-Immunoassays und es können theoretisch bis zu 30 Proteine simultan nachgewiesen werden. Die spezifischen Antikörper werden über ihre Fc (*fragment crystallizable*)-Untereinheiten an Polystyrol-Mikropartikel (synthetische

Kügelchen mit Fluoreszenzfarbstoff im Inneren) gekoppelt. Mit den Fab (*Fragment antigen binding*)-Teilen werden die gewünschten löslichen Substanzen gebunden. Ein weiterer Fluoreszenzfarbstoff - Phycoerythrin (PE)-gekoppelter Detektionsantikörper, der ein anderes Epitop derselben Substanz bindet, wird zur Detektion eingesetzt.

Die bei -20 °C gelagerten Biopsieüberstände wurden bei 4 °C über Nacht aufgetaut. Für jedes Experiment wurde eine Standardverdünnungsreihe angefertigt. Dazu wurden die lyophilisierten Standards von jedem zu messenden Protein in ein 15 ml Röhrchen überführt, in 4 ml Assay Diluent (PBS mit Kalbserum) gelöst und für 15 Min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde eine Standardverdünnungsreihe mit dem Faktor zwei hergestellt. Als Nullwert diente eine Probe, die nur „Assay Diluent“ enthielt. Je 20 µl Standardlösung und 20 µl Probe wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die spezifischen Mikropartikel wurden 1:20 mit Bead Diluent (0,05% ProClin® 300) verdünnt und je 20 µl in jedes Reaktionsgefäß gegeben. Nach sorgfältigem Mischen wurden die Reaktionsgefäße im Dunkeln für eine Stunde bei RT inkubiert. Die spezifischen PE gekoppelten Detektionsantikörper wurden 1:20 mit Detection Diluent verdünnt und je 20 µl in alle Reaktionsgefäße überführt und die Proben für weitere zwei Stunden im Dunkeln bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben mit je 1 ml Waschpuffer gewaschen und 5 min bei 1400 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Sediment in 200 µl PBA aufgenommen.

Die Analyse der Proben wurde mit dem FACSCalibur vorgenommen und die Daten wurden mit der FCAP Array Software ausgewertet.

2.3.2 Immunhistochemie

Vorbereitung der Biopsate für die Immunhistochemie

Frische Biopsien wurden direkt nach der Entnahme drei Stunden lang bei Raumtemperatur in 4% PFA/PBS fixiert. Die Proben wurden dann im Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Benjamin Franklin mit Einbettautomaten über Nacht in Paraffin eingegossen. Zur Einbettung wurden die Präparate für je eine Stunde in 70%igem und 80%igem und für 45 Minuten in 96%igem Ethanol inkubiert, danach folgten drei Inkubationsschritte von je einer Stunde in 100%igem Ethanol, gefolgt von einer Stunde in Aceton und 90 Minuten in Xylol. Anschließend wurden die Proben für zweimal zwei Stunden in 65°C warmen Paraffin eingelegt, danach konnten sie in Paraffinblöcke eingebettet werden.

Von den Blöcken wurden mit dem Mikrotom (Microm, Walldorf) 5µm dicke Schnitte angefertigt, im 37°C warmen Wasserbad gestreckt und auf die Objektträger aufgebracht. Nach dem Trocknen bei 37°C über Nacht konnten die Schnitte weiter verarbeitet werden.

Vorbehandlung der Schnitte

Durch die Fixierung in Formalin und die aufwendige Einbettung in Paraffin, wird das Gewebe entwässert. Daher mussten die Schnitte vor den Färbungen zunächst von Paraffin befreit und wieder rehydriert werden. Während der Einbettung können einige Proteine so denaturiert werden, dass die gegen sie gerichteten Antikörper ihre Antigenen-Epitope nicht mehr erkennen können. Deswegen mussten die antigenen Epitope mittels Schnellkochtopf demaskiert werden, bevor eine Färbung möglich war.

Entparaffinisierung

Vor der Färbung mussten die Schnitte zunächst von Paraffin befreit und rehydriert werden. Dies geschah durch jeweils zehnmünütige Inkubation bei Raumtemperatur in Xylol, gefolgt von reinem Aceton, einer Mischung von Aceton und TBS im Verhältnis 1:2 und reinem TBS.

Antigen-Demaskierung

Die antigenen Epitope von FOXP3 auf den Schnitten mussten durch Schnellkochtopf-Behandlung demaskiert werden. Die Schnitte wurden nach der Entparaffinisierung in einen Schnellkochtopf mit Citratpuffer pH 6 gestellt und für zwei Minuten nach Druckaufbau gekocht. Anschließend wurden die Schnitte in TBS/Tween überführt.

FOXP3 Färbung

Nach der Demaskierung wurden die Schnitte kurz mit TBS gespült, endogene Peroxidase durch Inkubation in 3%igem Wasserstoffperoxid für 10 Min. blockiert und die Schnitte anschliessend 3x mit VE Wasser gespült. Die Schnitte wurden mit einem Fettstift umrandet und in TBS gestellt. Die Inkubation mit anti-FOXP3 (ebioscience; Host: Ratte) erfolgte in einer Verdünnung von 1:200 in Antibody Diluent (DAKO) (pro Schnitt 20 – 50µl je nach Größe des Schnittes) für 30 Min. bei RT. Die Schnitte wurden mit einer mit TBS gefüllten Spritzflasche gewaschen (ca. 5 – 6x), überflüssiges TBS abgeschüttelt und 30 Min. bei RT mit einem Biotin-gekoppelten Antikörper gegen Ratten-IgG (Host: Kaninchen) in einer Verdünnung von 1:200 (in PBS Puffer) inkubiert, anschließend wieder mit TBS gewaschen und abgeschüttelt. Danach wurden die Schnitte für 1h Envision anti rabbit/anti

mouse (lag in fertiger Form vor und konnte direkt aus der Flasche auf den Schnitt je nach Schnittgröße 2 – 3 Tropfen angewandt werden) inkubiert, anschließend mit TBS gewaschen und in mit TBS gefüllte Küvetten überführt, TBS wieder ausgeschüttet und Küvette mit DAB gefüllt; die Entwicklung erfolgte unter Sicht, je nach Ermessen blieb DAB in Küvette; kontrolliert wurde durch mikroskopieren. Eine Reaktion konnte schon nach 2-3 Min. oder auch nach 15-20 Min. beobachtet werden. Die Schnitte wurden mit VE Wasser 5 – 6 mal gespült und anschließend für 30 Sek. in eine mit Hämatoxilin gefüllte Küvette getaucht (dies darf nicht länger als 30 Sek. erfolgen, da sonst Hämatoxilin das DAB überfärben könnte), zum Bläuen wird ca. 3 – 4 mal Leitungswasser in Küvette gefüllt und wieder ausgegossen (bis das Spülwasser klar wurde) und die Schnitte eingedeckelt. Es wurde darauf geachtet, dass die Schnitte nicht länger als 30 min mit TBS-Tween inkubiert waren, um ein Aufquellen und Ablösen vom Objektträger zu vermeiden.

Auswertung der Färbungen

Im Lichtmikroskop wurde die Anzahl der braun angefärbten FOXP3+ Zellen pro Gesichtsfeld (hpf, high power field) bei einer 400-fachen Vergrößerung ausgezählt. Pro Probe wurde die Zellzahl pro 10 hpf bestimmt und der Mittelwert gebildet.

2.4 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS für Windows, Version 22.0 (SPSS Inc., U.S.A.) durchgeführt. Die Darstellung der metrischen Variablen erfolgte als Mittelwerte und Mediane, während die Streumaße als Standardabweichungen und Quartile angegeben wurden.

Die metrischen Variablen wurden mit Hilfe von Shapiro-Wilk-Tests hinsichtlich ihrer Normalverteilung überprüft. Die getesteten Variablen wiesen ganz überwiegend keine Normalverteilung auf ($p < 0,05$). Aufgrund dessen wurden bei den Vergleichen der Stichproben nicht-parametrische Tests für nicht normalverteilte Stichproben herangezogen.

Beim Vergleich von 2 unabhängigen, nicht normalverteilten Stichproben wurde der Mann-Whitney-U-Test und bei mehr als 2 unabhängigen, nicht normalverteilten Stichproben der H-Test nach Kruskal und Wallis angewendet. Beim Vergleich von mehr als 2 verbundenen, nicht normalverteilten Stichproben wurde der Friedman-Test angewendet.

Bei allen angewandten Tests erfolgte eine zweiseitige Signifikanzüberprüfung, wobei für alle statistischen Tests ein p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant angenommen wurde. Die Grafiken wurden mit SPSS sowie mit Word erstellt. Zur Darstellung der Mediane und Quartilsabstände wurden Boxplots angefertigt. Während in den Boxen der Median sowie die 25.-75. Perzentile dargestellt

sind, entsprechen die T-Balken dem kleinsten und größten Wert, sofern diese keine Ausreißer bzw. Extremwerte sind. Die Ausreißer sind Werte, die zwischen $1\frac{1}{2}$ - 3 Boxlängen außerhalb der Box lagen; sie sind in den Grafiken als Kreise dargestellt, während Extremwerte, die mehr als 3 Boxlängen außerhalb der Box gemessen wurden, als Kreuze gezeigt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Konzentration der Zytokine in Biopsieüberständen

Um den Einfluss der Impfstämme (DB2, DB4, Kontrollserum) auf die lokale Zytokin-Sekretion zu untersuchen, erfolgten Gastroskopien mit Entnahme der Biopsien aus dem Antrum, Corpus und Duodenum zu drei verschiedenen Zeitpunkten. Die Gastroskopie 1 erfolgte zur Screening 21 Tage vor der Impfung, und die Gastroskopie 2 wurde 80 Tage nach der Impfung bzw. ca. 40 Tage nach der Belastungsinfektion durchgeführt. Die 3. Gastroskopie erfolgte entsprechend 120 Tage nach der Impfung bzw. 80 Tage nach der Belastungsinfektion. Dabei zeigte sich, dass nach der Belastungsreaktion (Gastroskopie 2) die durchschnittliche Sekretion der Zytokine im Antrum meist etwas höher war als im Duodenum.

Das wesentliche Charakteristikum in Bezug auf die Konzentrationen der Zytokine in Biopsieüberständen war, dass sich in allen Fällen die initialen Sekretionswerte von allen sezernierten Zytokinen nach der Belastungsinfektion etwa um den Faktor 2 bis 5 steigerten. Im weiteren Verlauf, zum Zeitpunkt der 3. Gastroskopie, konnte dann in allen Fällen wieder ein Absinken der durchschnittlichen Konzentrationen der Zytokine in den Überständen festgestellt werden. Die Messwerte der dritten Gastroskopie entsprachen in etwa wieder dem Ausgangsbefund (Gastroskopie 1) bzw. lagen zum Teil sogar etwas darunter. Für kein Zytokin konnte für den initialen Befund, den Anstieg nach der Belastungsinfektion und den Abfall im weiteren Verlauf ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen (DB2, DB4, Kontrolle) festgestellt werden. Aufgrund dessen werden hier nur exemplarisch die Ergebnisse für $\text{INF}\gamma$ als Th1 Marker, $\text{TNF}\alpha$ als proinflammatorisches Zytokin, IL-4 als Th2 Marker und IL-10 als regulatorisches Zytokin gezeigt und diskutiert.

3.1.1 Nachweis von Interferon (INF) γ in Biopsieüberständen

In den folgenden zwei Grafiken ist der Verlauf der Konzentration von $\text{INF}\gamma$ in den Überständen der Antrum-Biopsien dargestellt. Die mittleren $\text{INF}\gamma$ Konzentrationen erhöhten sich im Gesamtkollektiv signifikant von initial 19,3 pg/mg Biopsat (Mittelwert mit SD) bei der ersten Gastroskopie auf 36,3 pg/mg Biopsat bei der zweiten Gastroskopie ($p < 0,001$ /Friedman Test). Im weiteren Verlauf sanken

die Zytokinkonzentrationen bei allen drei Gruppen (DB2, DB4, Kontrolle) auf nicht mehr messbare Werte ab und entsprachen somit wieder dem niedrigen Ausgangsniveau bzw. lagen sogar signifikant ($p < 0,001$ /Friedman Test) darunter (Abb. 1).

Zu keinem der drei Messzeitpunkte lagen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den drei Prüfgruppen (DB2, DB4, Kontrolle) vor; beispielsweise ergab sich der kleinste p-Wert ($p = 0,193$ /H-Test) im Antrum bei der 3. Gastroskopie (Abb. 2).

Innerhalb der Prüfgruppen fanden sich statistische Unterschiede nur bei der Kontrollgruppe (mit 21 Probanden) mit signifikant niedriger $INF\gamma$ Konzentration zum Zeitpunkt der 3. Gastroskopie im Vergleich zum Ausgangswert (Kontrollgruppe: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,004$). Bei den Gruppen DB2 und DB4 (mit jeweils 11 Probanden) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Ausgangswerten, zum Zeitpunkt der 1. Gastroskopie, und den Werten zum Zeitpunkt der 3. Gastroskopie (Abb. 2).

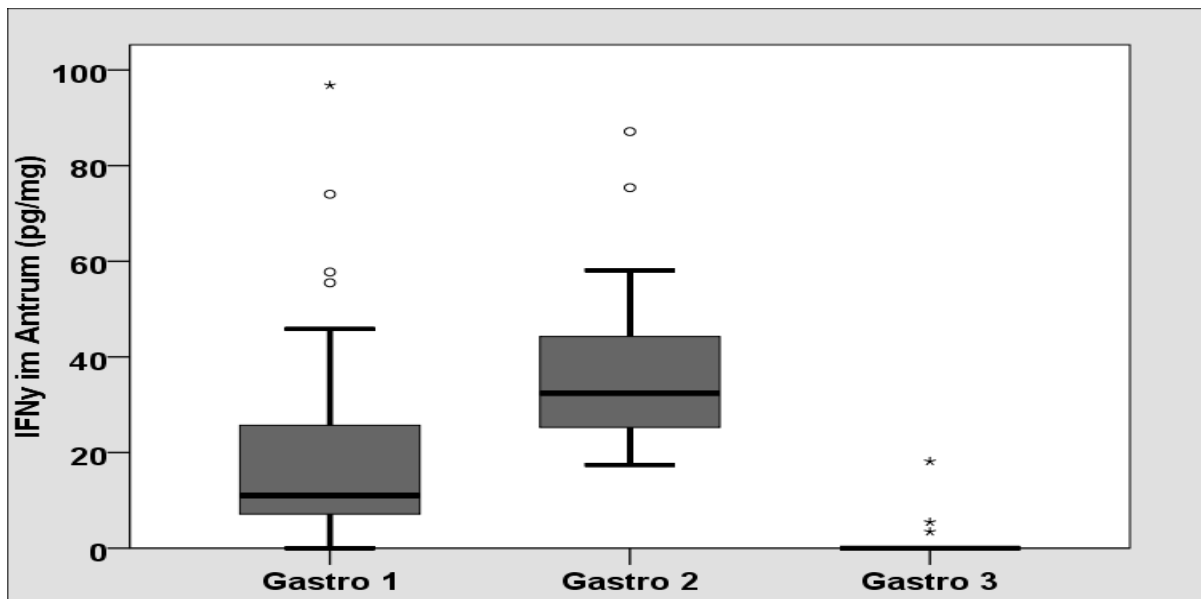


Abb. 1: $INF\gamma$ in den Antrum-Biopsien im Studienverlauf bei Gesamtkollektiv. Signifikanter Anstieg nach der Impfung und Belastungsinfektion (Tag 80, Gastroskopie 2), signifikanter Abfall im Infektionsverlauf (Tag 120, Gastroskopie 3) in der Friedmans Zweifachrangvarianzanalyse verbundener Stichproben: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 $p < 0,001$, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$. Gastro: Gastroskopie

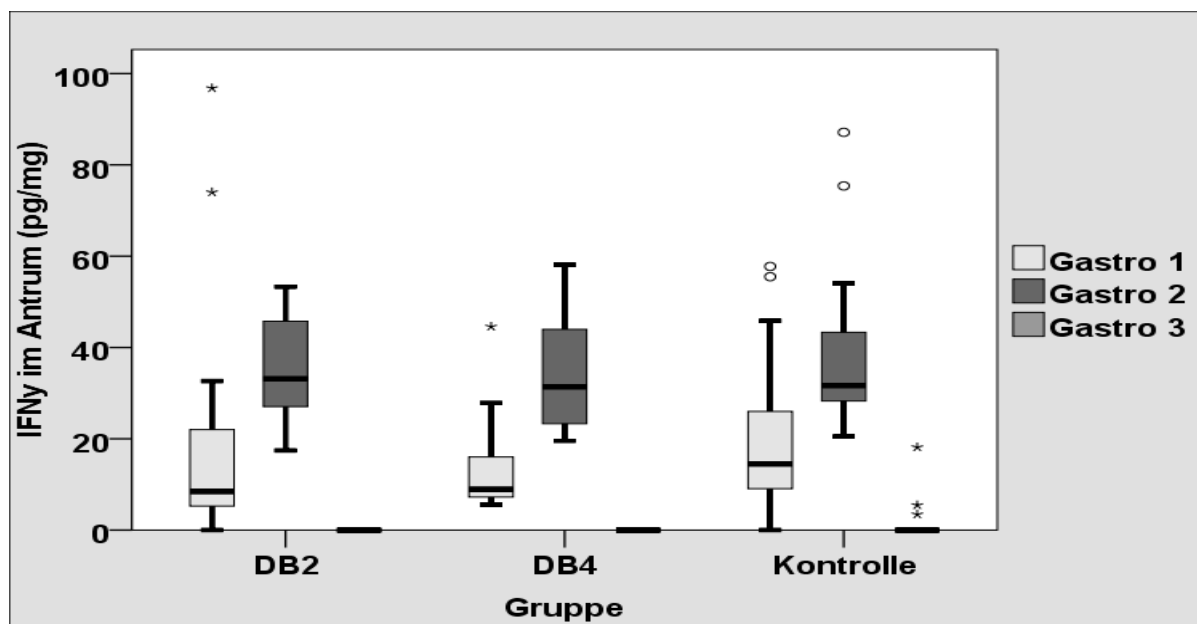


Abb. 2: Übersichtsgrafik: IFN γ in den Antrum-Biopsien im Studienverlauf bei den einzelnen Prüfgruppen. Friedmans Zweifachrangvarianzanalyse verbundener Stichproben: DB2: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 ns. DB4: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 ns. Kontrollgruppe: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p = 0,004$.

Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Prüfgruppen / Kruskal-Wallis-Test: DB2 vs. DB4, DB4 vs. Kontrollgruppe, DB2 vs. Kontrollgruppe. Gastro: Gastroskopie

Die entsprechenden Konzentrationen von IFN γ in Biopsien aus dem Duodenum wiesen ein ähnliches Bild auf. Im Gesamtkollektiv erhöhten sich die mittleren IFN γ Konzentrationen initial nominell von 26,7 pg/mg auf 34,3 pg/mg Biopsat (MW mit SD, $p = 0,253$); diese Erhöhung war statistisch nicht signifikant. Anschließend sanken die mittleren IFN γ Konzentrationen im weiteren Verlauf, zum Zeitpunkt der 3. Gastroskopie, signifikant unter das Ausgangsniveau ab ($p < 0,001$ /Friedman Test) (Abb. 3).

Statistische Unterschiede innerhalb der Prüfgruppen fanden sich auch im Duodenum nur bei der Kontrollgruppe (mit 21 Probanden) mit signifikant niedriger IFN γ Konzentration zum Zeitpunkt der 3. Gastroskopie im Vergleich zum Ausgangswert (Kontrollgruppe: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$). Bei den Gruppen DB2 und DB4 (mit jeweils 11 Probanden) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Ausgangswerten, zum Zeitpunkt der 1. Gastroskopie, und den Werten zum Zeitpunkt der 3. Gastroskopie (Abb. 4).

Auch hier lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Prüfgruppen vor; der kleinste p -Wert ($p = 0,237$ /H-Test) ergab sich im Duodenum bei der 1. Gastroskopie (Abb. 4).

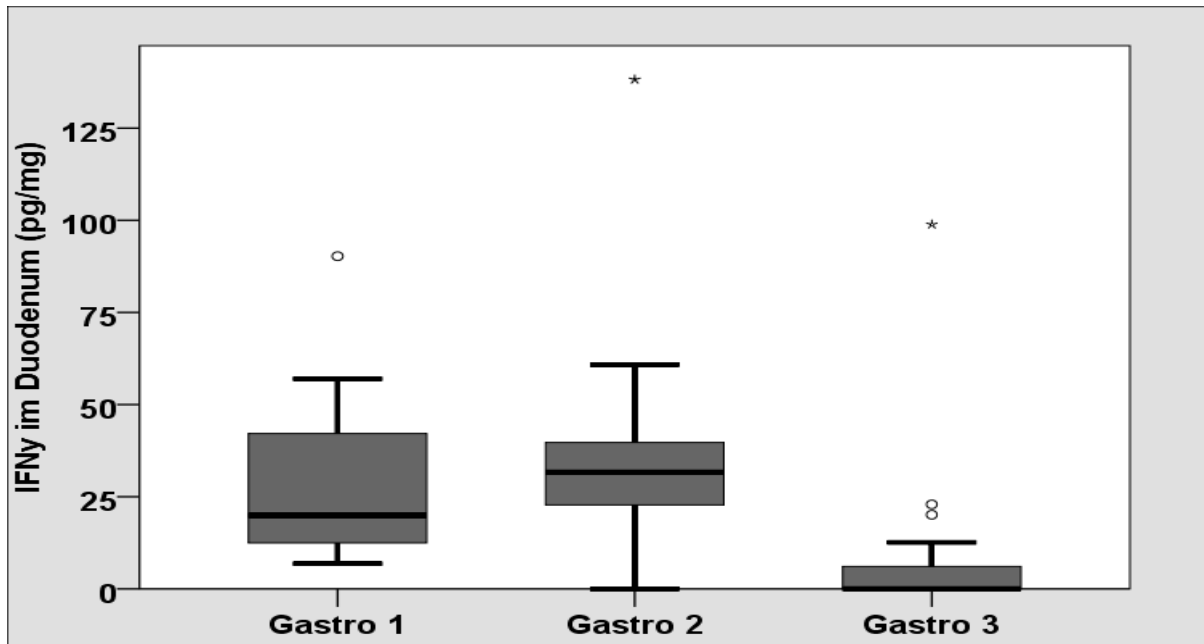


Abb. 3: IFN γ in den Duodenum-Biopsien im Studienverlauf bei Gesamtkollektiv. Kein signifikanter Anstieg nach der Impfung und Belastungsinfektion (Tag 80, Gastroskopie 2), jedoch signifikanter Abfall im Infektionsverlauf (Tag 120, Gastroskopie 3) in der Friedmans Zweifachrangvarianzanalyse verbundener Stichproben: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$. Gastro: Gastroskopie

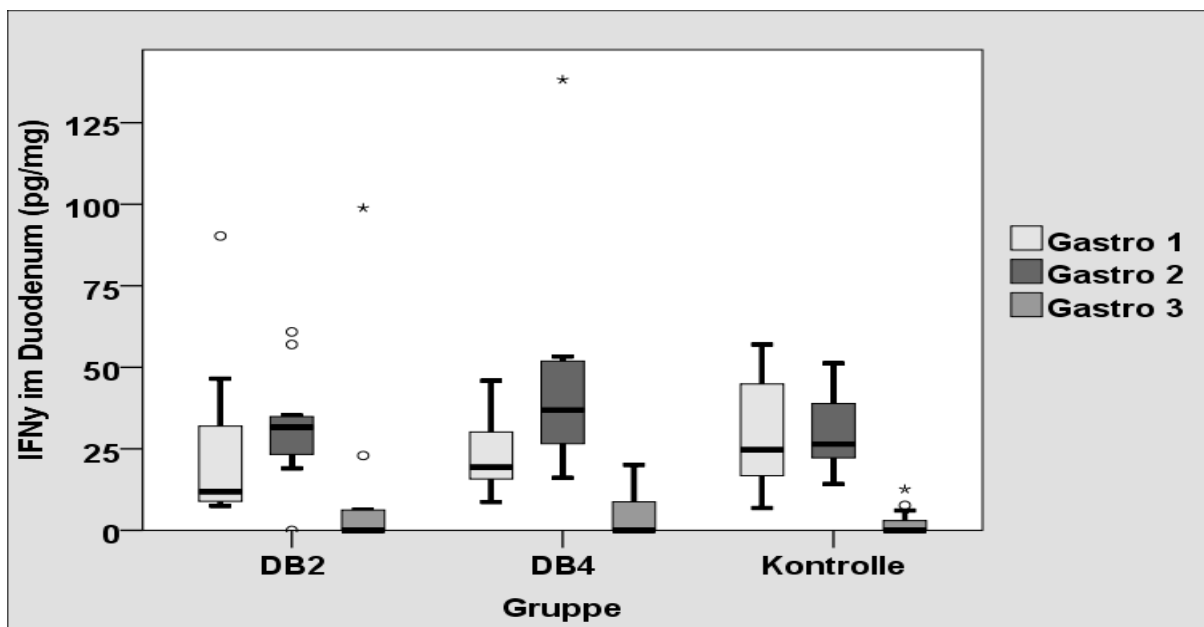


Abb. 4: Übersichtsgrafik: IFN γ in den Duodenum-Biopsien im Studienverlauf bei den einzelnen Prüfgruppen. Friedmans Zweifachrangvarianzanalyse verbundener Stichproben: DB2: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p = 0,032$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 ns. DB4: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 ns. Kontrollgruppe: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$. Keine signi-

signifikanten Unterschiede zwischen den Prüfgruppen / Kruskal-Wallis-Test: DB2 vs. DB4, DB4 vs. Kontrollgruppe, DB2 vs. Kontrollgruppe. Gastro: Gastroskopie

3.1.2 Nachweis von TNF α in Biopsieüberständen

Die Konzentration von TNF α in den Überständen von Antrum-Biopsien wiesen von etwa 6,13 pg/mg Biopsat (MW mit SD) initial einen signifikanten Anstieg bei der 2. Gastroskopie auf 15,2 pg/mg Biopsat (MW mit SD, $p < 0,001$ /Friedman Test) auf. Im weiteren Verlauf fielen diese Werte ab, so dass bei der 3. Gastroskopie Werte gemessen wurden, die etwas unterhalb des Ausgangsbefundes lagen (3,7pg/mg Biopsat MW mit SD, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$ / Friedman Test) (Abb. 5).

Im Duodenum zeigte sich wiederum ein anderes Bild; es kam bei der 2. Gastroskopie zu keinem signifikanten Anstieg der Konzentrationen von TNF α . Jedoch auch hier sanken die Werte im weiteren Verlauf signifikant ($p < 0,001$ / Friedman Test) unter das Ausgangsniveau ab (Abb. 7).

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den drei Prüfgruppen konnten auch in Bezug auf die Sekretion von TNF α weder in den Antrum- (der kleinste p-Wert ($p = 0,271$ /H-Test) bei der 1. Gastroskopie) noch in den Duodenum-Biopsien (der kleinste p-Wert ($p = 0,137$ / H-Test) zu keinem der drei Messzeitpunkte festgestellt werden (Abb. 6 und 8).

Ferner fanden sich wesentliche statistische Unterschiede innerhalb der drei Prüfgruppen bei der DB4- und der Kontrollgruppe: Im Antrum kam es zu signifikant erhöhten TNF α – Konzentrationen zum Zeitpunkt der 2. Gastroskopie (Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 DB4: $p = 0,017$ und Kontrollgruppe: $p = 0,016$) und im Duodenum kam es zu signifikanten niedrigeren TNF α – Konzentrationen zum Zeitpunkt der 3. Gastroskopie im Vergleich zu Ausgangswerten (Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 DB4: $p = 0,032$ und Kontrollgruppe: $p < 0,001$) (Abb. 6 und 8).

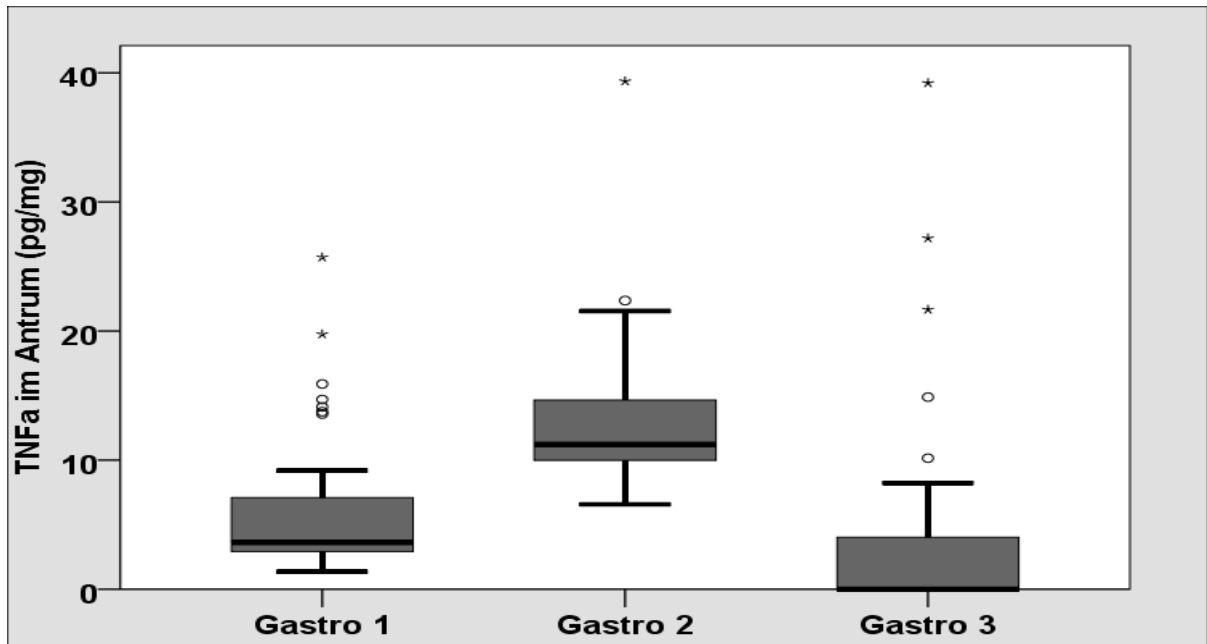


Abb. 5: TNF α in den Antrum-Biopsien im Studienverlauf bei Gesamtkollektiv. Signifikanter Anstieg nach der Impfung und Belastungsinfektion (Tag 80, Gastroskopie 2), signifikanter Abfall im Infektionsverlauf (Tag 120, Gastroskopie 3) in der Friedmans Zweifachrangvarianzanalyse verbundener Stichproben: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 $p < 0,001$, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,039$. Gastro: Gastroskopie

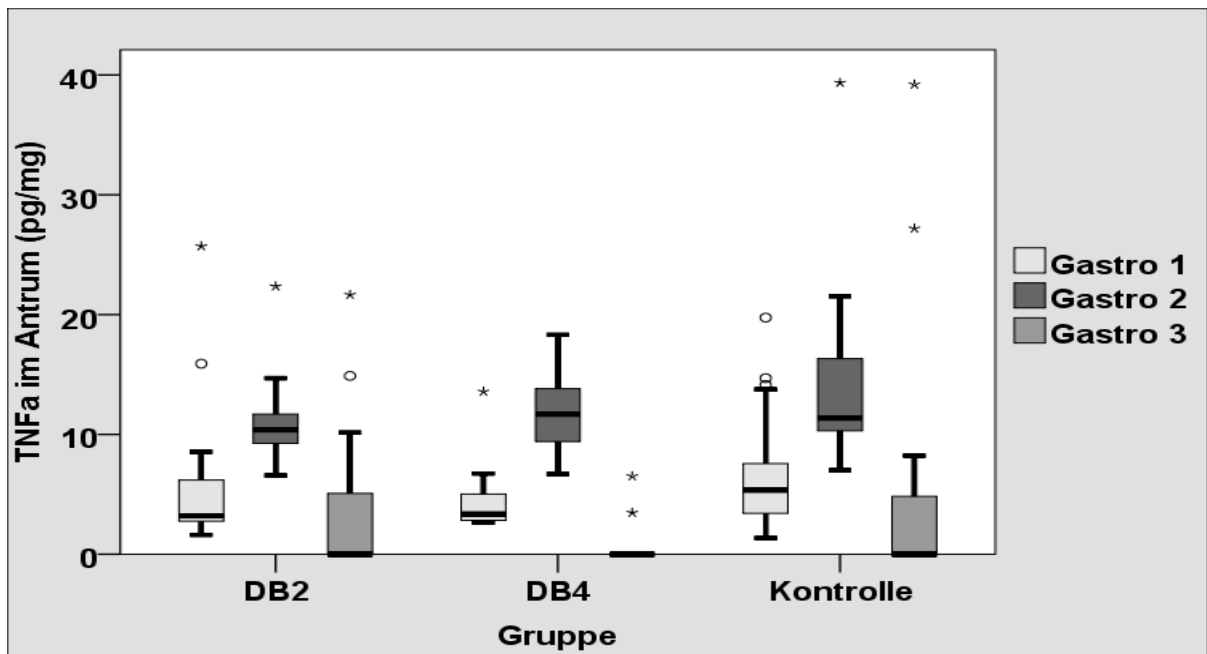


Abb. 6: Übersichtsgrafik: TNF α in den Antrum-Biopsien im Studienverlauf bei den einzelnen Prüfgruppen. Friedmans Zweifachrangvarianzanalyse verbundener Stichproben: DB2: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p = 0,009$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 ns. DB4: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 $p = 0,017$, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 ns. Kontrollgruppe: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 $p = 0,016$, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 ns. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Prüfgruppen / Kruskal-Wallis-Test: DB2 vs. DB4, DB4 vs. Kontrollgruppe, DB2 vs. Kontrollgruppe. Gastro: Gastroskopie

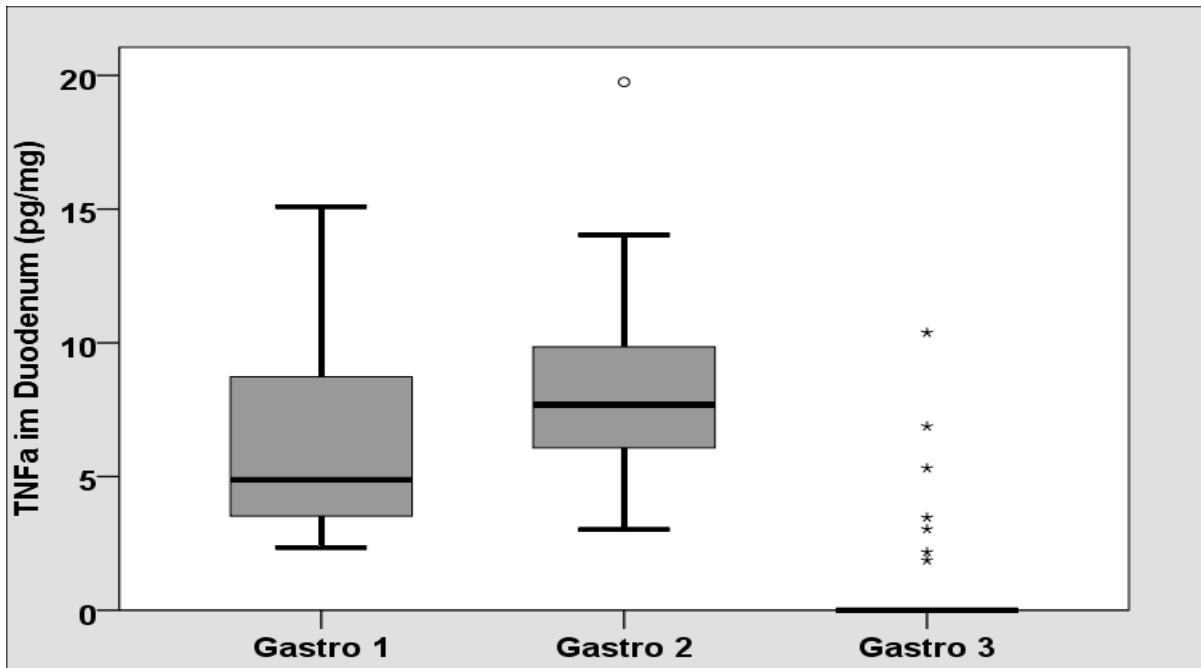


Abb.7: TNF α in den Duodenum-Biopsien im Studienverlauf bei Gesamtkollektiv. Kein signifikanter Anstieg nach der Impfung und Belastungsinfektion (Tag 80, Gastroskopie 2), signifikanter Abfall im Infektionsverlauf (Tag 120, Gastroskopie 3) in der Friedmans Zweifachrangvarianzanalyse verbundener Stichproben: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$. Gastro: Gastroskopie

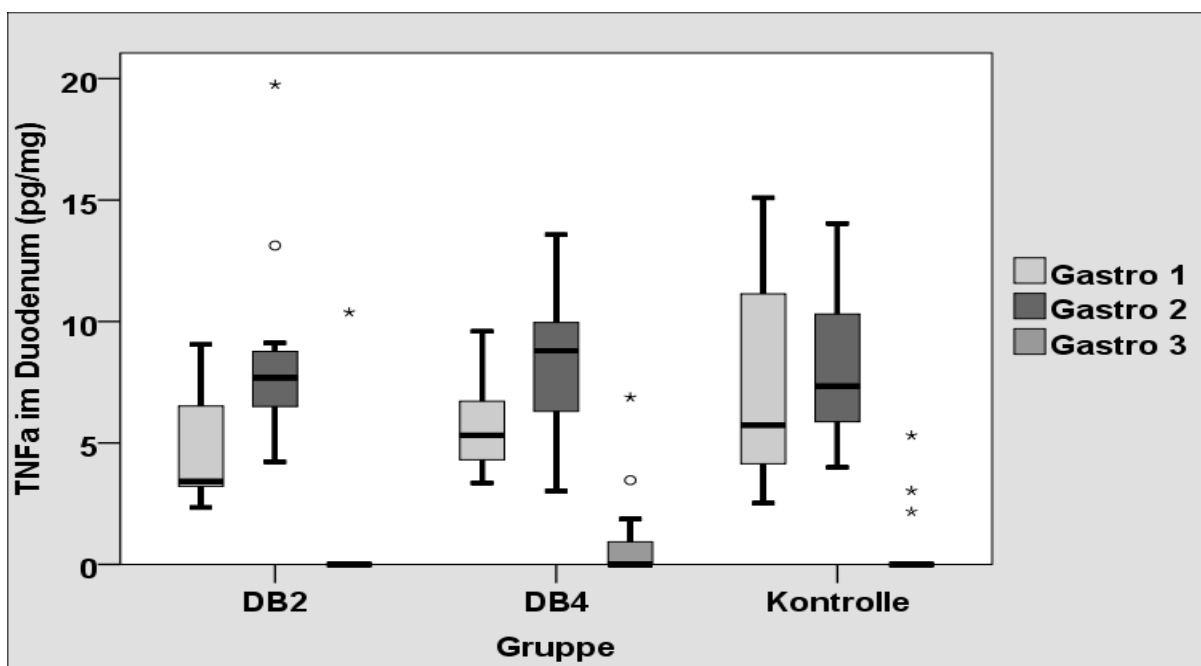


Abb. 8: Übersichtsgrafik: TNF α in den Duodenum-Biopsien im Studienverlauf bei den einzelnen Prüfgruppen. Friedmans Zweifachrangvarianzanalyse verbundener Stichproben: DB2: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p = 0,001$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 ns. DB4: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p = 0,032$. Kontrollgruppe: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$.

Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Prüfgruppen / Kruskal-Wallis-Test: DB2 vs. DB4, DB4 vs. Kontrollgruppe, DB2 vs. Kontrollgruppe. Gastro: Gastroskopie

Die Bestimmung des TNF α wurde zusätzlich noch in einer zweiten Messung, die alle inflammatorischen Zytokine beinhaltet, durchgeführt. Der Verlauf der Messwerte war im Wesentlichen mit den oben dargestellten Ergebnissen vergleichbar.

3.1.3 Nachweis von IL-4 in Biopsieüberständen

Auch in Bezug auf das Zytokin IL-4 waren die Ergebnisse mit den oben beschriebenen Befunden vergleichbar.

In den Antrum-Biopsien wurden im Gesamtkollektiv zum Zeitpunkt der 1. Gastroskopie von initial hohen IL-4 Konzentrationen (MW mit SD 10,05 pg/mg Biopsat) bei der 2. Gastroskopie eine signifikante Steigerung auf 18,66 pg/mg Biopsat (MW mit SD, $p=0,005$ /Friedman Test) festgestellt. Auch hier sanken diese Messwerte im weiteren Verlauf wieder unter das Ausgangsniveau ab (Abb. 9).

Innerhalb der Prüfgruppen konnten keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden. Bei der 2. Gastroskopie fanden sich in den Gruppen DB2 und DB4 (mit jeweils 11 Probanden) sowie in der Kontrollgruppe (mit 21 Probanden) kein signifikanter Anstieg der IL-4 Konzentrationen (beispielsweise DB2: $p=0,407$ /Friedman Test), jedoch zum Zeitpunkt der 3. Gastroskopie zeigten sich signifikant niedrigere IL-4 Konzentrationen (Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 DB2: $p<0,001$, DB4: $p<0,001$, Kontrollgruppe: $p<0,001$ / Friedman Test) (Abb. 10).

Signifikante Unterschiede zwischen den drei Prüfgruppen konnten nicht festgestellt werden; der kleinste p-Wert ($p=0,358$ /H-Test) ergab sich bei der 1. Gastroskopie (Abb.10).

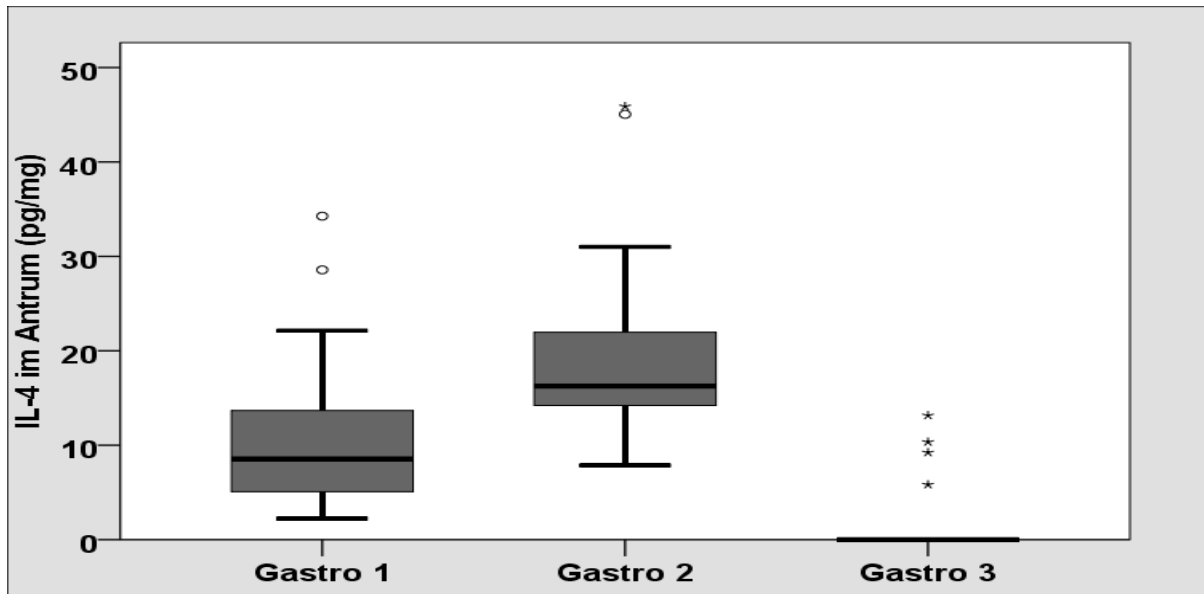


Abb. 9: IL-4 in den Antrum-Biopsien im Studienverlauf bei Gesamtkollektiv. Signifikanter Anstieg nach der Impfung und Belastungsinfektion (Tag 80, Gastroskopie 2), signifikanter Abfall im Infektionsverlauf (Tag 120, Gastroskopie 3) in der Friedmans Zweifachrangvarianzanalyse verbundener Stichproben: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 $p=0,005$, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p<0,001$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p<0,001$. Gastro: Gastroskopie

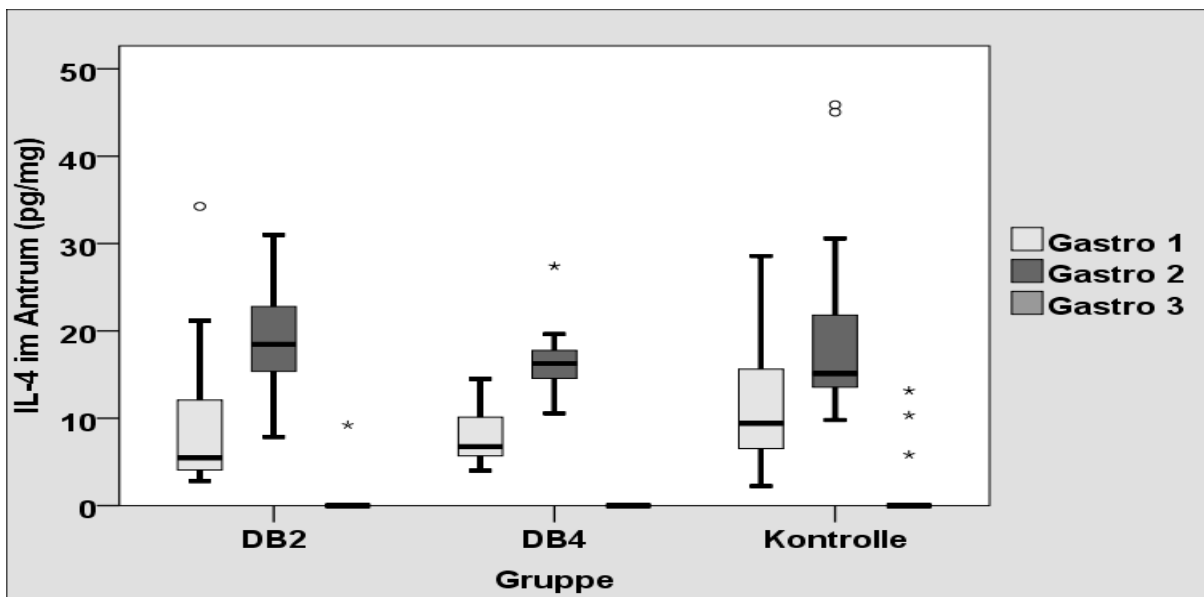


Abb. 10: Übersichtsgrafik: IL-4 in den Antrum-Biopsien im Studienverlauf bei den einzelnen Prüfgruppen. Friedmans Zweifachrangvarianzanalyse verbundener Stichproben: DB2: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p<0,001$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 ns. DB4: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p<0,001$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 ns. Kontrollgruppe: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p<0,001$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p=0,001$. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Prüfgruppen / Kruskal-Wallis-Test: DB2 vs. DB4, DB4 vs. Kontrollgruppe, DB2 vs. Kontrollgruppe. Gastro: Gastroskopie

Auch die Ergebnisse der Duodenum-Biopsien sind ähnlich der oben beschriebenen Befunden. Bereits initial, bei der 1. Gastroskopie, lagen die IL-4 Konzentrationen in den Duodenum-Biopsien etwas höher bei 14,75 pg/mg (MW mit SD); bei der 2. Gastroskopie konnte im Gesamtkollektiv nominelle jedoch keine statistisch signifikante Steigerung der IL-4 Konzentrationen ($p=0,483$ /Friedman Test) festgestellt werden. Bei der 3. Gastroskopie waren die Messwerte unter das initiale Ausgangsniveau gesunken (Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p<0,002$ / Friedman Test (Abb. 11).

Auch hier lagen zu keinem der drei Messzeitpunkte signifikante Unterschiede zwischen den drei Prüfgruppen vor; der kleinste p-Wert ($p=0,096$ /H-Test) ergab sich im Duodenum bei der 1. Gastroskopie (Abb. 12). Innerhalb der Prüfgruppen zeigten sich signifikante Unterschiede lediglich bei der Kontrollgruppe mit 21 Probanden (Abb. 12).

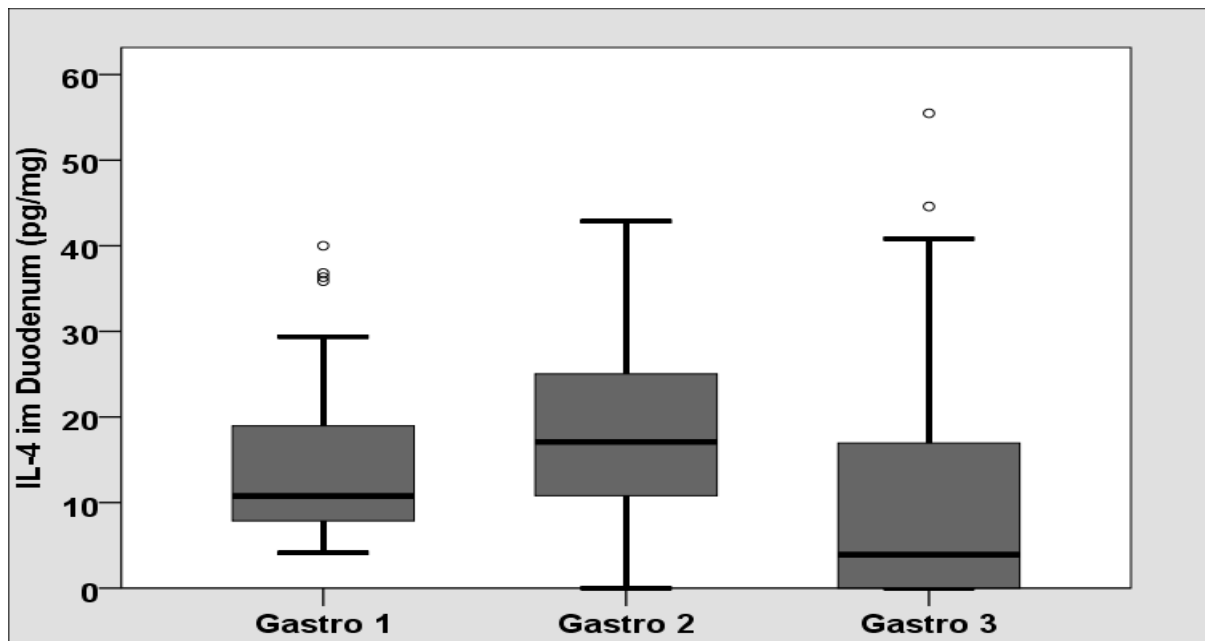


Abb. 11: IL-4 in den Duodenum-Biopsien im Studienverlauf bei Gesamtkollektiv. Kein signifikanter Anstieg nach der Impfung und Belastungsinfektion (Tag 80, Gastroskopie 2), signifikanter Abfall im Infektionsverlauf (Tag 120, Gastroskopie 3) in der Friedmans Zweifachrangvarianzanalyse verbundener Stichproben: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p<0,002$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 ns. Gastro: Gastroskopie

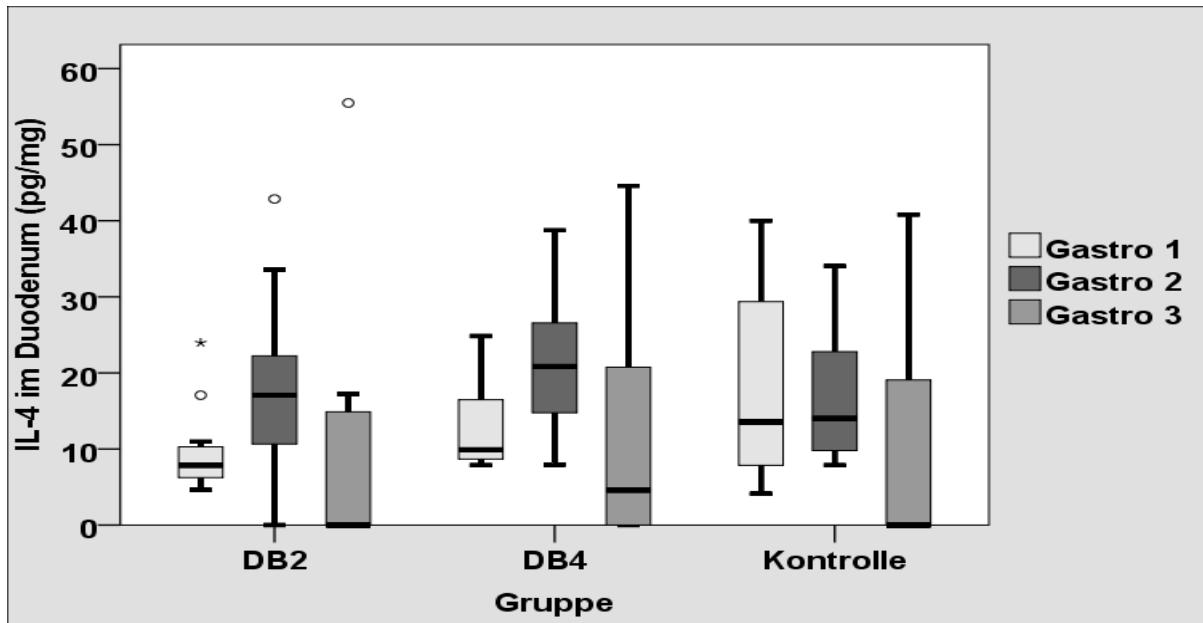


Abb. 12: Übersichtsgrafik: IL-4 in den Duodenum-Biopsien im Studienverlauf bei den einzelnen Prüfgruppen.

Friedmans Zweifachrangvarianzanalyse verbundener Stichproben: DB2: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 ns, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 ns. DB4: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 ns, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 ns. Kontrollgruppe: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 p=0,027, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 p=0,021.

Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Prüfgruppen / Kruskal-Wallis-Test: DB2 vs. DB4, DB4 vs. Kontrollgruppe, DB2 vs. Kontrollgruppe. Gastro: Gastroskopie

3.1.4 Nachweis von IL-10 in Biopsieüberständen

Für das Zytokin IL-10 wurden, wie weiter oben für den TNF α beschrieben, Messungen sowohl mit dem CBA für T-Helfer-Zellen (TH-CBA), als auch mit dem CBA für inflammatorische Zytokine durchgeführt. Die beiden Messungen waren vergleichbar, weshalb nur die Ergebnisse des TH-CBA dargestellt sind. Der Verlauf war qualitativ wieder mit den Ergebnissen der anderen Zytokine vergleichbar.

Es kam im Gesamtkollektiv zu einem initialen signifikanten Anstieg (p<0,001 / Friedman Test) und im weiteren Verlauf zu signifikantem Abfall der sekretierten IL-10 (p<0,001 / Friedman Test) in den Antrum-Biopsien. Auch hier ergaben sich keine statistischen Unterschiede zwischen den Prüfgruppen zu den drei Messzeitpunkten (der kleinste p-Wert 0,686 / H-Test bei der 2. Gastroskopie) (Abb. 13-14). Auch innerhalb der Prüfgruppen zeigten sich exakt ähnliche Ergebnisse (Abb. 14).

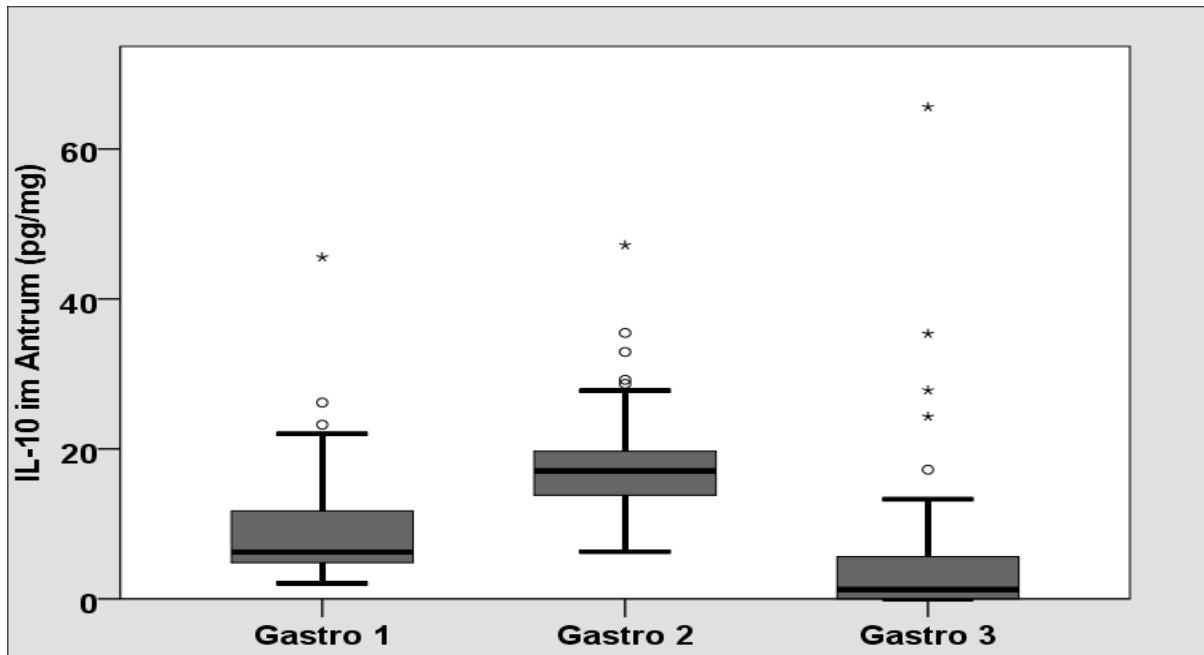


Abb. 13: IL-10 in den Antrum-Biopsien im Studienverlauf bei Gesamtkollektiv. Signifikanter Anstieg nach der Impfung und Belastungsinfektion (Tag 80, Gastroskopie 2), signifikanter Abfall im Infektionsverlauf (Tag 120, Gastroskopie 3) in der Friedmans Zweifachrangvarianzanalyse verbundener Stichproben: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 $p=0,001$, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p<0,001$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p=0,018$. Gastro: Gastroskopie

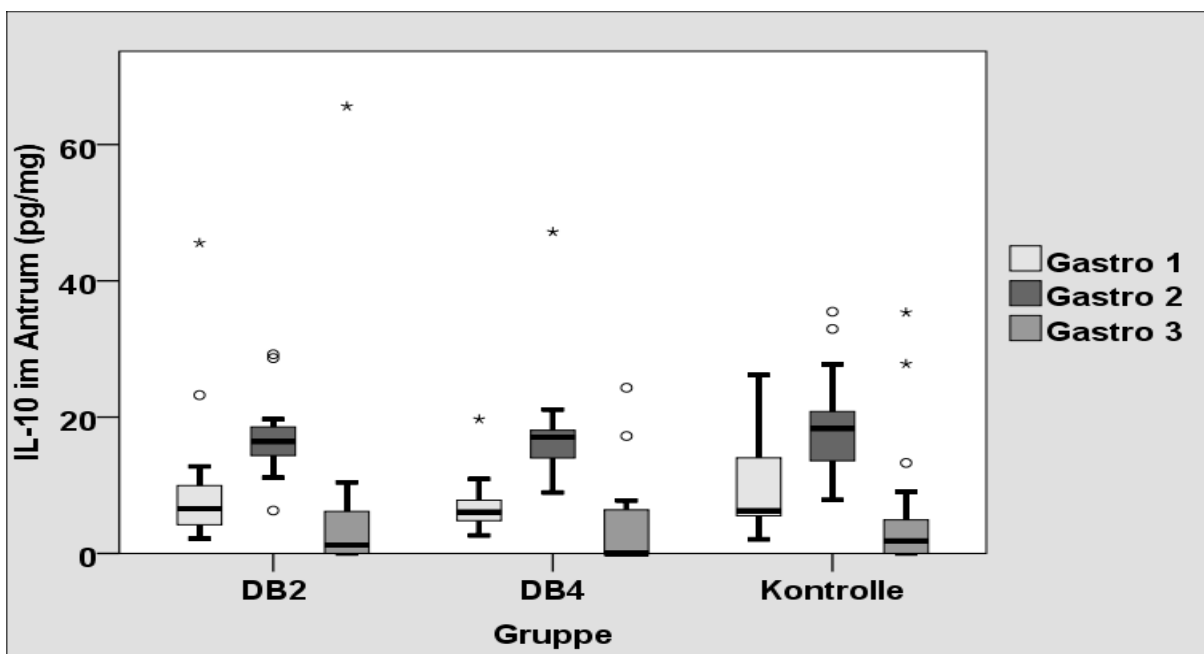


Abb. 14: Übersichtsgrafik: IL-10 in den Antrum-Biopsien Im Studienverlauf bei den einzelnen Prüfgruppen. Friedmans Zweifachrangvarianzanalyse verbundener Stichproben: DB2: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 $p=0,012$, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p=0,009$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 ns. DB4: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 $p=0,032$, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p=0,004$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 ns. Kontrollgruppe: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 $p=0,003$, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p<0,001$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 ns.

Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Prüfgruppen / Kruskal-Wallis-Test: DB2 vs. DB4, DB4 vs. Kontrollgruppe, DB2 vs. Kontrollgruppe. Gastro: Gastroskopie

Im Duodenum zeigte sich kein signifikanter Anstieg nach der Impfung und Belastungsinfektion (Gastroskopie 2), jedoch ein signifikanter Abfall im Infektionsverlauf (Gastroskopie 3) $p=0,001$ / Friedman Test (Abb. 15-16). Es ergaben sich zu keinem der drei Messzeitpunkte signifikante Unterschiede zwischen den Prüfgruppen; der kleinste p-Wert mit 0,062 / H-Test wurde bei der 1. Gastroskopie errechnet (Abb. 16). Innerhalb der Prüfgruppen zeigten sich signifikante Unterschiede lediglich bei der Kontrollgruppe mit 21 Probanden (Abb. 16).

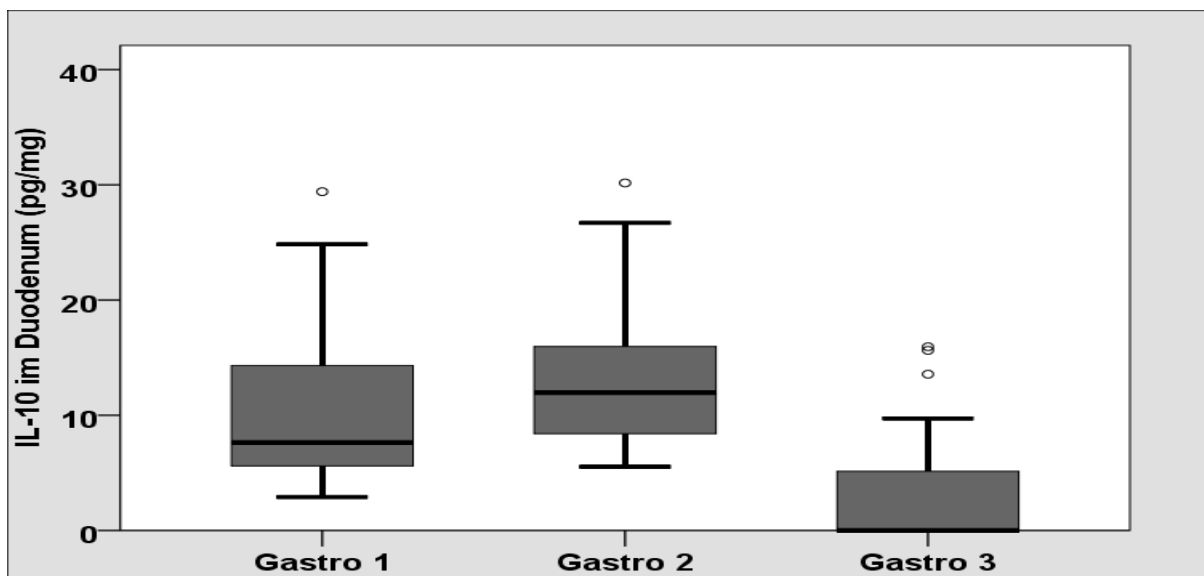


Abb. 15 : IL-10 in den Duodenum-Biopsien im Studienverlauf bei Gesamtkollektiv. Kein signifikanter Anstieg nach der Impfung und Belastungsinfektion (Tag 80, Gastroskopie 2), signifikanter Abfall im Infektionsverlauf (Tag 120, Gastroskopie 3) in der Friedmans Zweifachrangvarianzanalyse verbundener Stichproben : Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p<0,001$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p<0,001$. Gastro: Gastroskopie

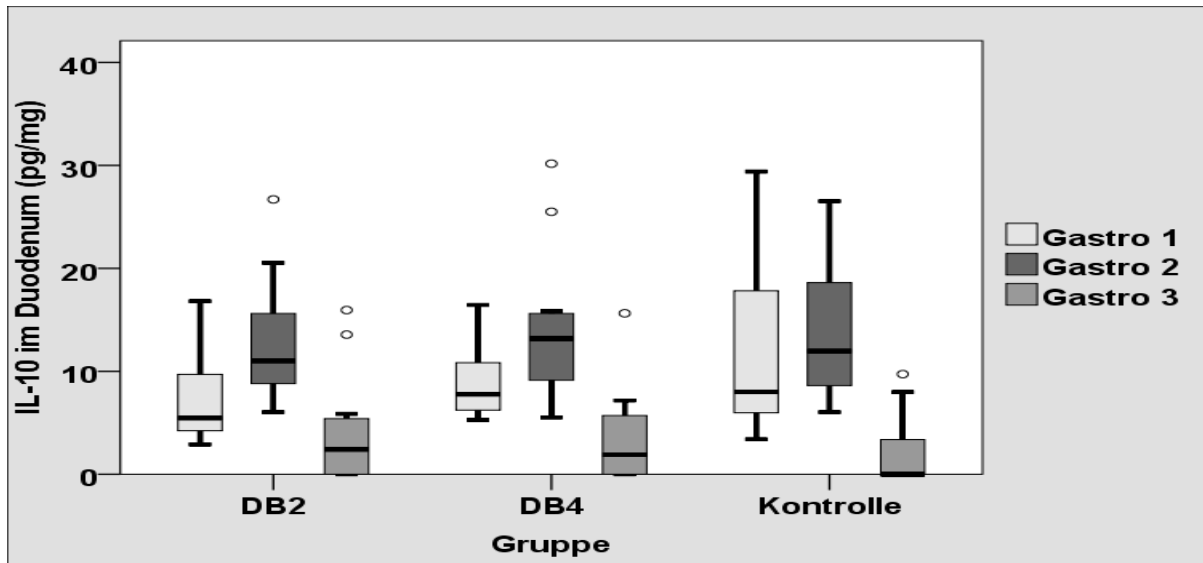


Abb. 16 : Übersichtsgrafik: IL-10 in den Duodenum-Biopsien im Studienverlauf bei den einzelnen Prüfgruppen.

Friedmans Zweifachrangvarianzanalyse verbundener Stichproben: DB2: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p=0,017$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 ns. DB4: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p=0,004$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 ns. Kontrollgruppe: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p<0,001$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p=0,001$.

Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Prüfgruppen / Kruskal-Wallis-Test: DB2 vs. DB4, DB4 vs. Kontrollgruppe, DB2 vs. Kontrollgruppe. Gastro: Gastroskopie

3.2 Die Anzahl der FOXP3+ T_{reg} Zellen in Biopsien

In den folgenden Abbildungen ist die Anzahl der FOXP3- T-Zellen in der Mukosa aus Antrum und Duodenum dargestellt.

Im Antrum zeigte sich zum Zeitpunkt der 2. Gastroskopie keine Steigerung der Anzahl der FOXP3+ T-Zellen, jedoch bei der 3. Gastroskopie fand sich eine signifikante Steigerung der Anzahl der FOXP3+ T-Zellen, ($p=0,001$ / Friedman Test, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 im Gesamtkollektiv) (Abb. 17).

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den drei Prüfgruppen konnten allerdings nicht festgestellt werden (Abb. 18). Unabhängig von der Prüfgruppe, konnte also festgestellt werden, dass es im Verlauf der Belastungsinfektion zunächst zu einer geringen und später zu einer stärkeren Erhöhung der Anzahl der FOXP3+ T_{reg} gekommen war.

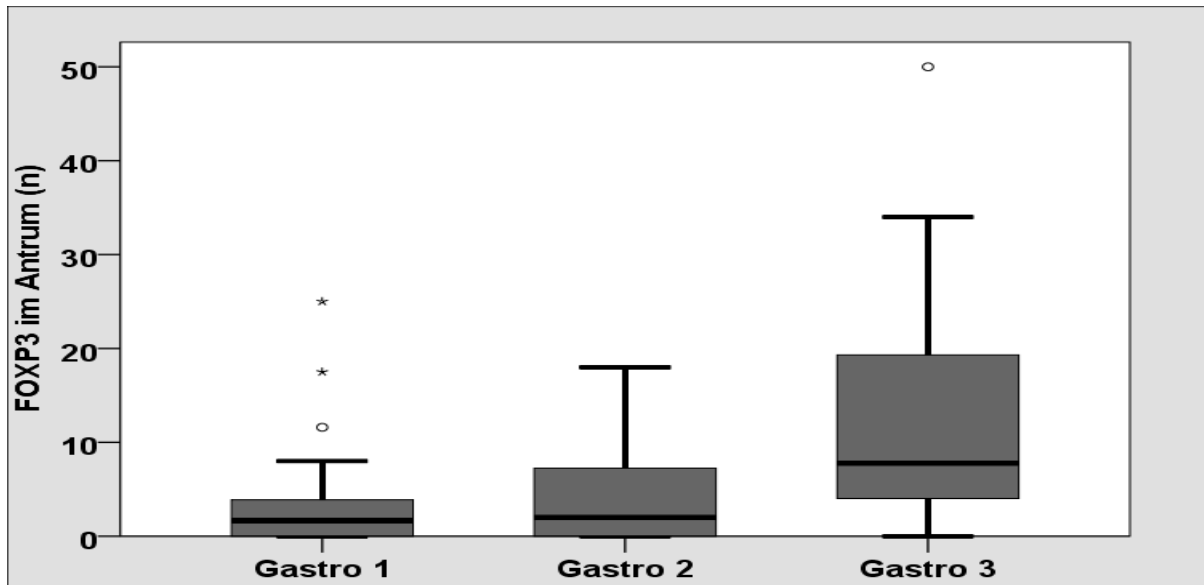


Abb. 17: Die Anzahl der FOXP3+ Zellen (n pro 10 hpf) in den Antrum-Biopsien im Studienverlauf bei Gesamtkollektiv. Kein signifikanter Anstieg nach der Impfung und Belastungsinfektion (Tag 80, Gastroskopie 2), signifikanter Anstieg im Infektionsverlauf (Tag 120, Gastroskopie 3) in der Friedmans Zweifachrangvarianzanalyse verbundener Stichproben: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p=0,001$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p<0,001$. Gastro: Gastroskopie

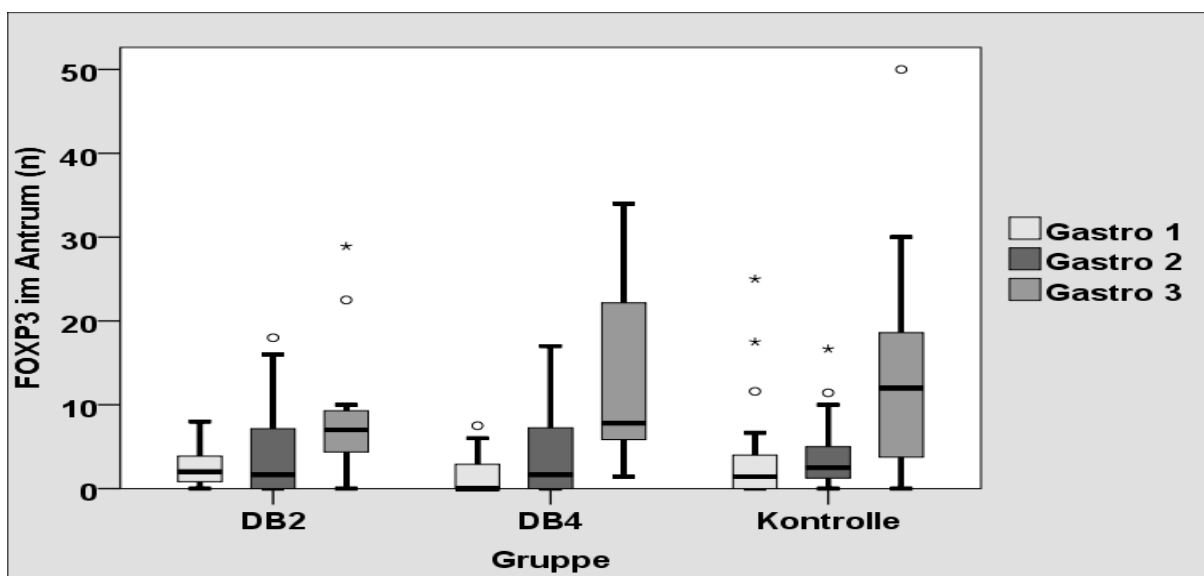


Abb. 18: Übersichtsgrafik: Die Anzahl der FOXP3+ Zellen (n pro 10 hpf) in den Antrum-Biopsien im Studienverlauf bei den einzelnen Prüfgruppen. Friedmans Zweifachrangvarianzanalyse verbundener Stichproben: DB2: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 ns, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 ns. DB4: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 ns, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p=0,012$. Kontrollgruppe: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 ns, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p=0,005$.

Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Prüfgruppen / Kruskal-Wallis-Test: DB2 vs. DB4, DB4 vs. Kontrollgruppe, DB2 vs. Kontrollgruppe. Gastro: Gastroskopie

Bei der Duodenum-Biopsie lag die Zahl der FOXP3+ T-Zellen, im Vergleich zu den Befunden der Antrum-Biopsie, bereits initial relativ hoch. Im weiteren Verlauf, zum Zeitpunkt der 2. Gastroskopie, war ein signifikantes Absinken ($p=0,013$ /Friedman Test) der Anzahl von FOXP3+ Zellen zu erkennen. Die Werte bei der dritten Kontrolle lagen etwa auf dem Niveau der Ausgangsbefunde. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den drei Prüfgruppen konnten allerdings nicht festgestellt werden (Abb. 19 und 20).

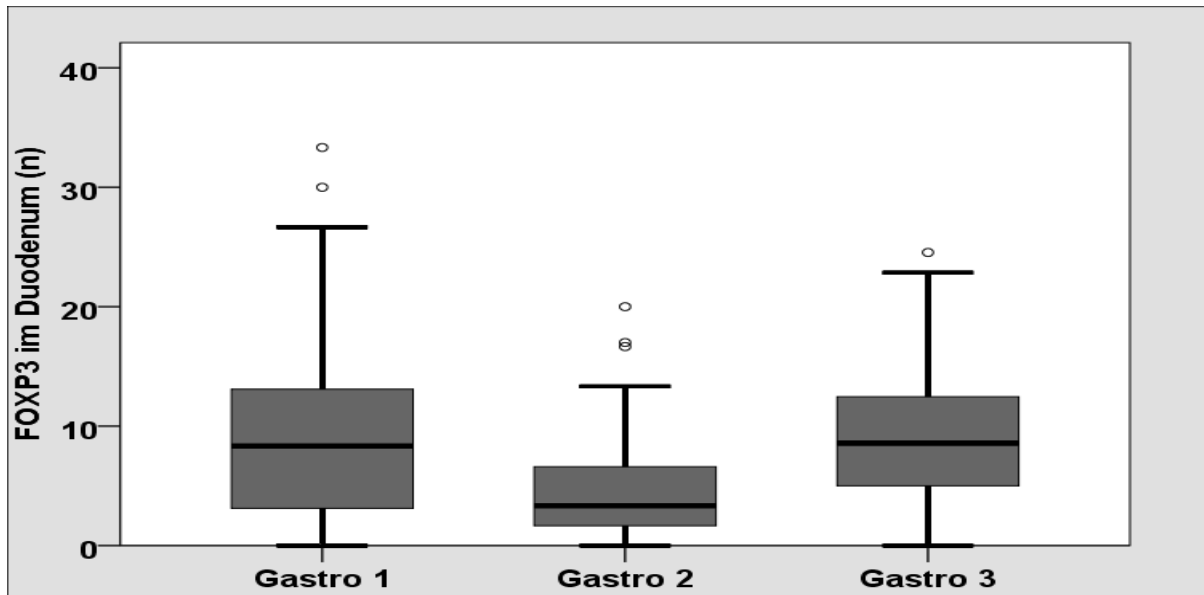


Abb. 19: Die Anzahl der FOXP3+ Zellen (n pro 10 hpf) in den Duodenum-Biopsien im Studienverlauf bei Gesamtkollektiv. Signifikanter Abfall nach der Impfung und Belastungsinfektion (Tag 80, Gastroskopie 2), signifikanter Anstieg im Infektionsverlauf (Tag 120, Gastroskopie 3) in der Friedmans Zweifachrangvarianzanalyse verbundener Stichproben: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 $p=0,013$, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p<0,001$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 ns. Gastro: Gastroskopie

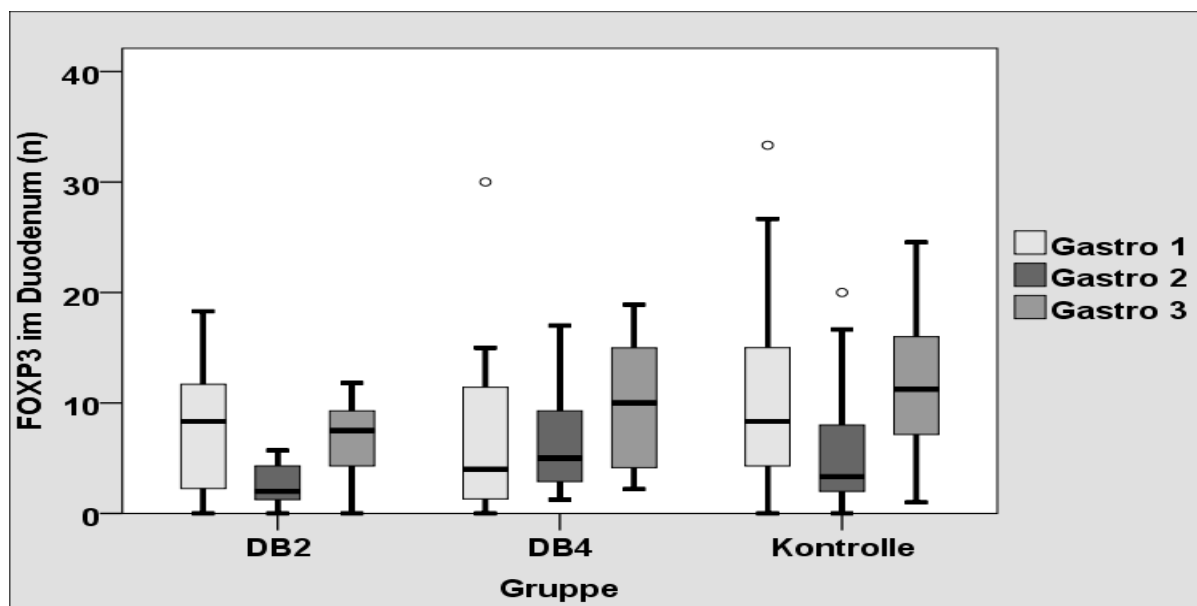


Abb. 20: Übersichtsgrafik: Die Anzahl der FOXP3+ Zellen (n pro 10 hpf) in den Duodenum-Biopsien im Studienverlauf bei den einzelnen Prüfgruppen. Friedmans Zweifachrangvarianzanalyse verbundener Stichproben: DB2: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 ns, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 ns. DB4: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 ns, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 ns. Kontrollgruppe: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 $p=0,016$, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p=0,001$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 ns.

Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Prüfgruppen / Kruskal-Wallis-Test : DB4 vs. Kontrollgruppe, DB2 vs. Kontrollgruppe, DB2 vs. DB4. Gastro: Gastroskopie

Die folgenden histopathologischen Befunde (3.3) und der *Helicobacter pylori* Nachweis (3.4) wurden nicht im Rahmen dieser Arbeit erhoben, sondern extern (von Prof. Stolte). Da sie jedoch für die Diskussion der Ergebnisse wichtig sind, sind sie hier dargestellt.

3.3 Histopathologische Befunde

Als Einzelparameter wurden im Rahmen der Studie zur Beurteilung der pathologischen Veränderungen der Mukosa von Antrum und Corpus die lymphoide Infiltration, die neutrophile Infiltration, die epitheliale Regeneration und der Mukosa-Abbau bestimmt. Aus den o. g. vier histopathologischen Einzelparametern wurde ein Summenscore gebildet. In Ergänzung dazu wurde als zusätzliche Methode noch der Grad der lymphoiden Aggregate sowohl anhand der Antrum- als auch der Corpus-Biopsie bestimmt. Diese Befunde wurden durch die externe Pathologie von Prof. Stolte erhoben.

Der Verlauf der Messwerte der lymphoiden Aggregate war im Wesentlichen mit den Ergebnissen der oben aufgeführten vier pathologischen Einzelparameter vergleichbar. Daher sind als Übersicht für die pathologischen Veränderungen der Mukosa bei der *H. pylori*-Infektion hier nur die zum Summenscore zusammengefassten histopathologischen Befunde dargestellt.

Insgesamt konnte festgestellt werden, dass die mittleren Summenscores sich von einem initial niedrigen Niveau zum Zeitpunkt der ersten Gastroskopie zu einem durchweg signifikant höheren Niveau ($p < 0,001$) zum Zeitpunkt der zweiten Gastroskopie entwickelten. Dieses Niveau blieb dann in den meisten Fällen stabil; etwaige Erhöhungen oder Verminderungen waren meist statistisch nicht signifikant. Lediglich in der Gruppe DB4 konnte bei der Corpus-Biopsie eine signifikante Verminderung zwischen der zweiten und dritten Gastroskopie festgestellt werden; und dies in Bezug auf immerhin alle vier Parameter.

In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der Summenscores aus den vier Einzelparametern dargestellt (Ergebnisse der Antrum-Biopsie). Es wird auf diese Weise nochmals der Verlauf zwischen der ersten und der dritten Gastroskopie verdeutlicht. Zum Einen wird klar ersichtlich, dass ein initial niedriger Summenscore in einen signifikant höheren überging ($p < 0,001$), und dass dieser höhere Score auch im Verlauf unverändert blieb. Zum Anderen lässt sich erkennen, dass zwischen den drei Prüfgruppen nur unwesentliche Unterschiede bestanden, die statistisch nicht signifikant waren (Abb. 21).

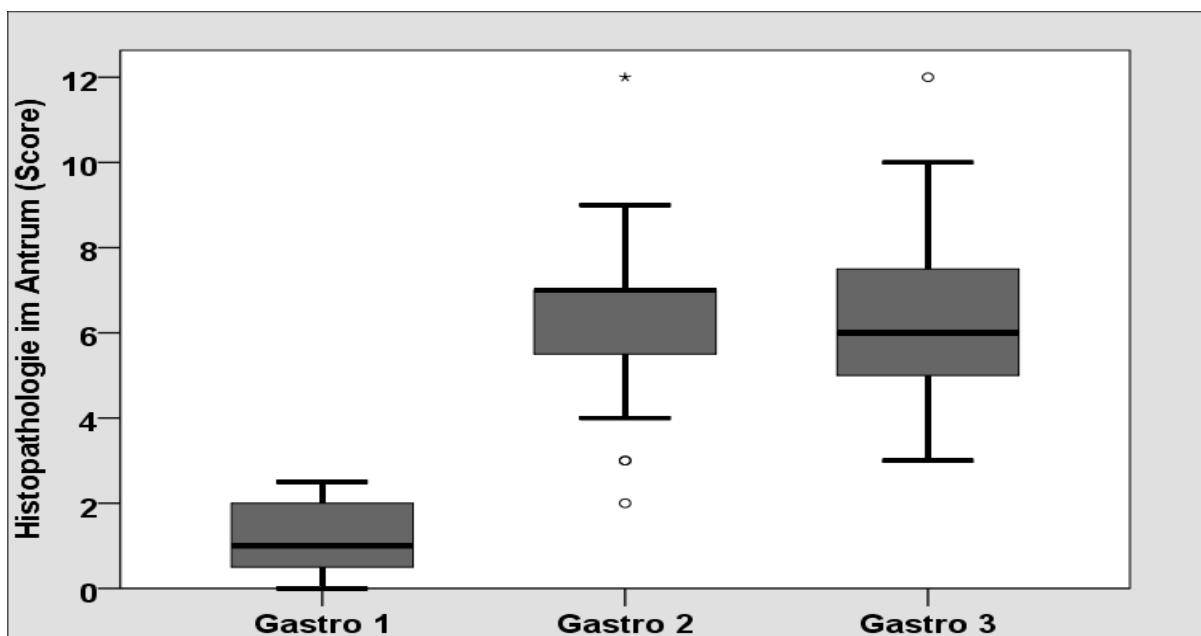


Abb. 21: Mittlerer Summenscore der vier histopathologischen Parameter (lymphoide Infiltration, neutrophile Infiltration, epitheliale Regeneration und Mukosa-Abbau) **in den Antrum-Biopsien im Studienverlauf bei Gesamtkollektiv.** Friedmans Zweifachrangvarianzanalyse verbundener Stichproben: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 $p < 0,001$, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 ns, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$. Gastro: Gastroskopie

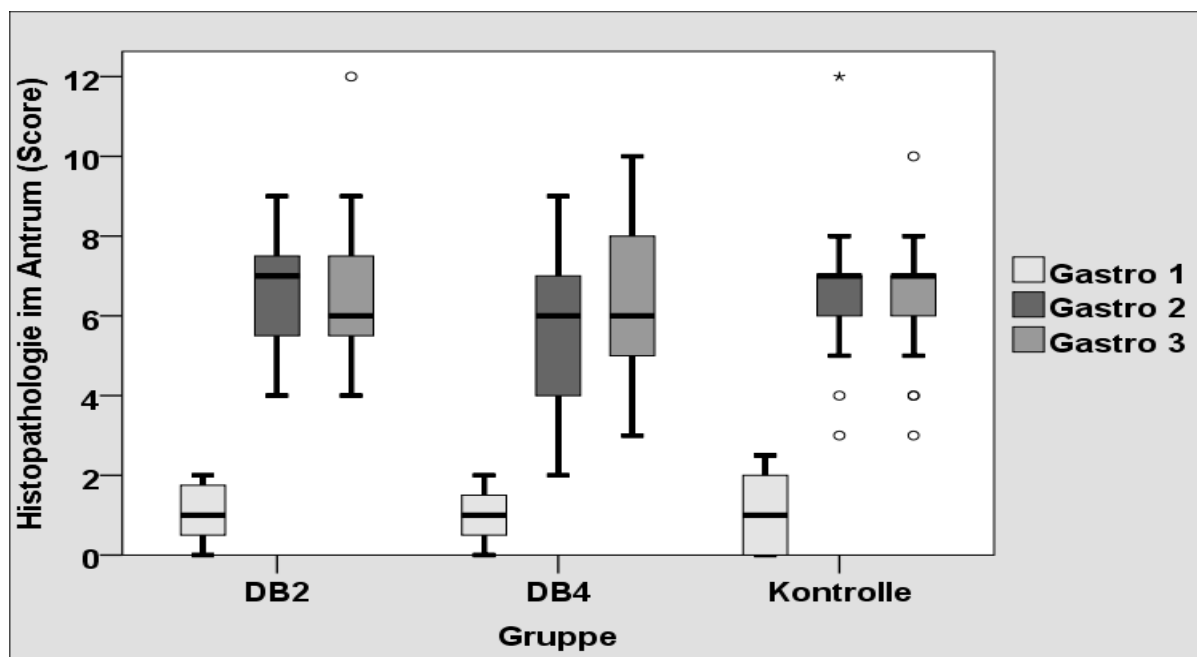


Abb. 22: Übersichtsgrafik: Mittlerer Summenscore der vier histopathologischen Parameter (lymphoide Infiltration, neutrophile Infiltration, epitheliale Regeneration und Mukosa-Abbau) **in den Antrum-Biopsien im Studienverlauf bei den einzelnen Prüfgruppen** in der Friedmans Zweifachrangvarianzanalyse verbundener Stichproben: DB2: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 $p=0,001$, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 ns, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p=0,003$. DB4: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 $p=0,009$, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 ns, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p<0,001$. Kontrollgruppe: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 $p<0,001$, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 ns, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p<0,001$.

Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Prüfgruppen / Kruskal-Wallis-Test: DB2 vs. DB4, DB4 vs. Kontrollgruppe, DB2 vs. Kontrollgruppe. Gastro: Gastroskopie

Bei der Corpus-Biopsie hatten sich hinsichtlich der Summenscores qualitativ ähnliche Verhältnisse ergeben. Auch hier zeigten initial niedrige Scores; bei allen drei Prüfgruppen kam es nach der Belastungsinfektion zu einem signifikanten Anstieg ohne Gruppenunterschied und blieben im weiteren Verlauf die Scores erhöht (Abb. 24).

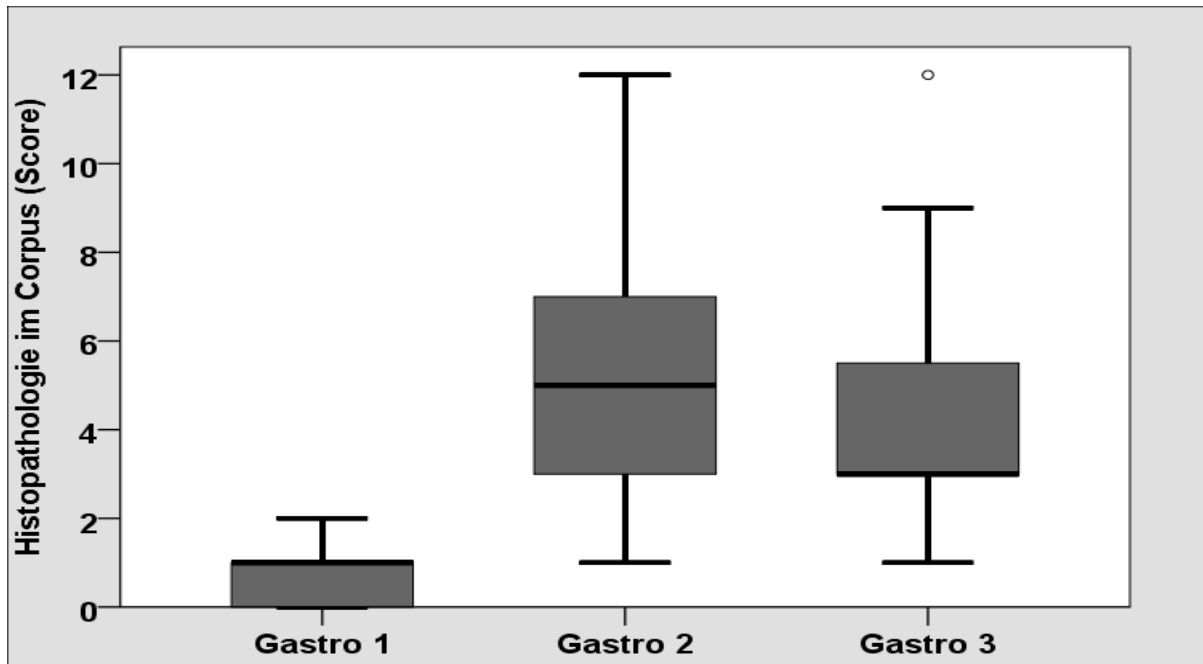


Abb. 23: Mittlerer Summenscore der vier histopathologischen Parameter (lymphoide Infiltration, neutrophile Infiltration, epitheliale Regeneration und Mukosa-Abbau) **in den Corpus-Biopsien im Studienverlauf bei Gesamtkollektiv.** Friedmans Rangvarianzanalyse verbundener Stichproben: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 $p < 0,001$, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 ns, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$.

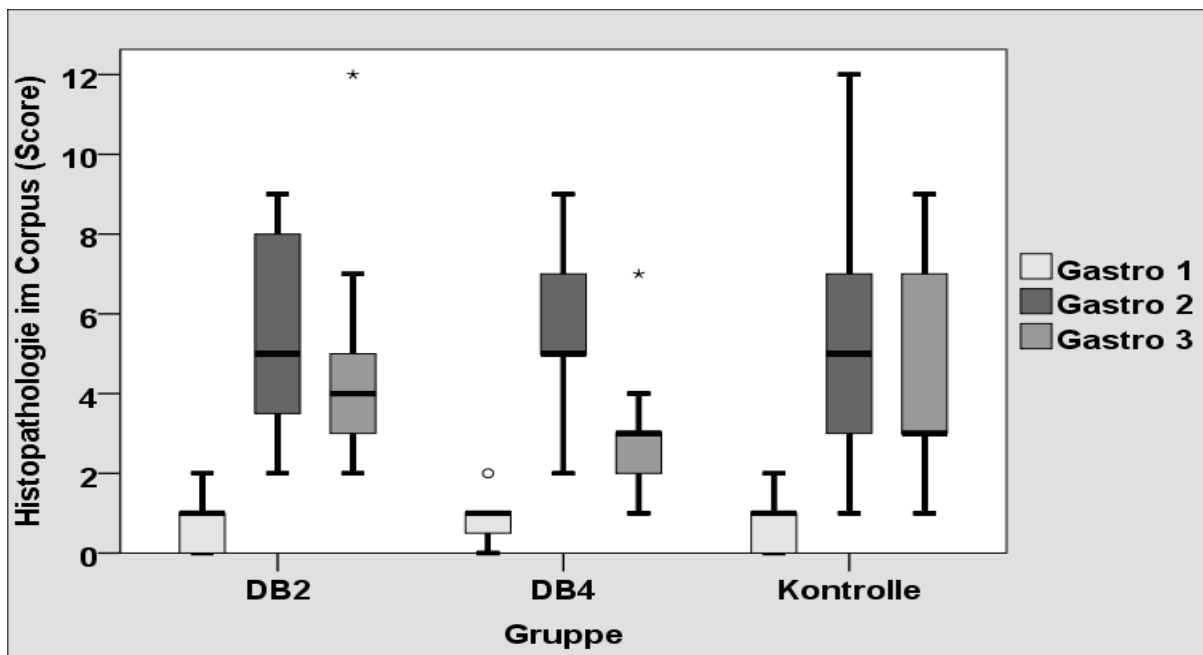


Abb. 24: Übersichtsgrafik: Mittlerer Summenscore der vier histopathologischen Parameter (lymphoide Infiltration, neutrophile Infiltration, epitheliale Regeneration und Mukosa-Abbau) **in den Corpus-Biopsien im Studienverlauf bei den einzelnen Prüfgruppen** in der Friedmans Zweifachrangvarianzanalyse verbundener Stichproben: DB2: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 $p < 0,001$, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 ns, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p = 0,009$. DB4: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 $p < 0,001$, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 ns, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie

3 p=0,032. Kontrollgruppe: Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 p<0,001, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 ns, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 p<0,001.

Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Prüfgruppen / Kruskal-Wallis-Test: DB2 vs. DB4, DB4 vs. Kontrollgruppe, DB2 vs. Kontrollgruppe. Gastro: Gastroskopie

3.4 *Helicobacter pylori* - Nachweis

Der *H. pylori*-Nachweis wurde mittels vier Verfahren durchgeführt: Nachweis in der Kultur (Anzuchtverfahren, nur im Antrum), Atemtest, Helicobacter-Urease-Test (HUT-Schnelltest, nur im Antrum durchgeführt) und histologischer Nachweis mittels Färbung (Warthin-Starry-Silver-Färbung (WS) im Antrum und Corpus). Die Ergebnisse dieser Tests sind hier beschrieben und die Summe der Nachweise in den folgenden Tabellen dargestellt.

Die Tests in allen Fällen der ersten Gastroskopie waren negativ. Bei der zweiten Gastroskopie fanden sich hinsichtlich des kulturellen *H. pylori*-Nachweises negative Befunde in der Gruppe DB4 in keinem Fall, in DB2 in einem Fall und in der Kontrollgruppe in zwei Fällen. Bei der dritten Kontroll-Gastroskopie fand sich lediglich in der Gruppe DB4 noch ein Proband mit negativem kulturellem Befund. In der Kontrollgruppe hingegen war der Anteil der negativen Befunde mit 19,0% (n=4) deutlich höher.

Beim Atemtest-Verfahren fand sich bei der zweiten Gastroskopie der höchste Anteil negativer Befunde in der Prüfgruppe DB2 mit 45,5% (n=5). In der Gruppe DB4 lag der Anteil bei 18,2% (n=2) und in der Kontrollgruppe bei 23,8% (n=5). In der Prüfgruppe DB2 verringerte sich der Anteil der negativen Befunde bei der dritten Gastroskopie auf 36,4% (n=4), während der Anteil in den beiden anderen Gruppen in etwa konstant blieb.

Ein relativ hoher Anteil negativer Befunde fand sich beim Urease-Test (HUT-Schnelltest), vor allem zum Zeitpunkt der zweiten Gastroskopie-Kontrolle. In der Kontrollgruppe fanden sich hier bei 52,4% (n=11) Probanden negative Ergebnisse. In den beiden Prüfgruppen lagen diese Anteile mit 45,5% (n=5) bei DB2 und 36,4% (n=4) bei DB4 etwas niedriger. Bei der dritten Kontroll-Gastroskopie war in der Prüfgruppe DB4 nur noch ein Proband negativ (9,1%). In der Gruppe DB2 lag der Anteil der negativen Befunde bei 36,4% (n=4) und in der Kontrollgruppe bei 38,1% (n=8).

Der histologische WS *H. pylori*-Nachweis wurde sowohl in den Antrum, als auch in den Corpus-Biopsien geführt. Bei den Antrum-Biopsien fanden sich bei der zweiten Kontrolle negative Befunde bei etwa 30 bis 40 Prozent der Probanden (DB2: 36,4%, n=4; DB4 27,3%, n=3; K: 38,1%, n=8).

Anders bei der dritten Gastroskopie: Hier war vor allem die Anzahl der negativen Befunde bei den beiden Prüfgruppen DB2 und DB4 deutlich zurückgegangen, also die bakterielle Last gestiegen (DB2: von 1,46 auf 2,18 ($p=0,039$); DB4: von 1,27 auf 2,27 ($p=0,027$)). Die entsprechenden negativen Anteile lagen bei 9,1% ($n=1$) für die Gruppe DB2 und bei 18,2% ($n=2$) für die Gruppe DB4; Am höchsten lagen die negativen Anteile in der Kontrollgruppe mit 33,3% ($n=7$).

Bei den Corpus-Biopsien fanden sich zum Zeitpunkt der zweiten Kontrolle hohe negative Anteile nur in der Gruppe DB2 und der Kontrollgruppe (DB2: 45,5%, $n=5$; K: 33,3%, $n=7$). In der Gruppe DB4 war nur ein Proband negativ (9,1%). Bei der dritten Kontrolle lagen die Anteile der negativen Befunde in den Gruppen DB2, DB4 und Kontrolle bei 18,2% ($n=2$), 18,2% ($n=2$) und 28,6% ($n=6$). Signifikante Unterschiede zwischen den drei Prüfgruppen konnten auch hinsichtlich dieses Parameters im Wesentlichen nicht gezeigt werden. Lediglich bei der Corpus-Biopsie wies bei der 2. Gastroskopie die Gruppe DB2 einen signifikant niedrigeren Score auf als die Gruppe DB4 (0,55 vs. 1,46; $p=0,014$ / H-Test). Allerdings glich sich dieser Score bei der dritten Gastroskopie wieder weitgehend den Scores der anderen beiden Gruppen an.

In der folgenden Tabelle ist die Anzahl der positiven Befunde auf der Basis der vier oben dargestellten Nachweisverfahren zum Zeitpunkt der 2. Gastroskopie dargestellt. In dem Fall, dass keines der vier Verfahren einen positiven Befund ergab, kann mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass der Proband auch tatsächlich keine *Helicobacter*-Infektion aufgewiesen hatte. Dies war bei je einem Probanden aus jeder der drei Prüfgruppen der Fall. Im Falle von nur maximal einem einzigen positiven Befund kann es sich ebenfalls noch um ein negatives Ergebnis handeln, da je nach Verfahren falsch positive Befunde möglich sind. Dies war in der Gruppe DB2 bei 27,3 % ($n=2$) der Probanden der Fall, in der Gruppe DB4 bei 9,1 % ($n=1$) und in der Kontrollgruppe bei 14,3 % ($n=2$). Insgesamt ließ sich nicht erkennen, dass die Anzahl der nicht-infizierten, geschützten Probanden in den drei Gruppen unterschiedlich war (Tab. 1).

Tabelle 1: Summe der positiven Befunde bei der 2. Gastroskopie (Basis: positiver Befund in Antrum oder Corpus mittels WS, HUT, Atemtest, Kultur).

Positive Befunde	DB2			DB4			Kontrollgruppe		
	Anzahl	%	kum. %	Anzahl	%	kum. %	Anzahl	%	kum. %
0	1	9,1	9,1	1	9,1	9,1	1	4,8	4,8
1	2	18,2	27,3	0	0,0	9,1	2	9,5	14,3
2	2	18,2	45,5	0	0,0	9,1	5	23,8	38,1
3	0	0,0	45,5	4	36,4	45,5	3	14,3	52,4
4	6	54,5	100	6	54,5	100	10	47,6	100

Bei der dritten Gastroskopie fand sich bei immerhin drei Probanden (14,3%) der Kontrollgruppe ein weitgehend negativer Befund (0 positive Befunde). In der Gruppe DB2 war dies bei keinem, in der Gruppe DB4 bei nur einem Probanden der Fall. Das Ergebnis von maximal einem positiven Befund fand sich in der Gruppe DB2 bei 9,1 % (n=1) der Probanden, in der Gruppe DB4 ebenfalls bei 9,1% (n=1) und in der Kontrollgruppe bei 23,8 % (n=2) (Tab. 2).

Tabelle 2: Summe der positiven Befunde bei der 3. Gastroskopie (Basis: positiver Befund in Antrum oder Corpus mittels WS, HUT, Atemtest, Kultur).

Positive Befunde	DB2			DB4			Kontrolle		
	Anzahl	%	kum. %	Anzahl	%	kum. %	Anzahl	%	kum. %
0	0	0,0	0,0	1	9,1	9,1	3	14,3	14,3
1	1	9,1	9,1	0	0,0	9,1	2	9,5	23,8
2	3	27,3	36,4	0	0,0	9,1	1	4,8	28,6
3	0	0,0	36,4	2	18,2	27,3	4	19,0	47,6
4	7	63,6	100	8	72,7	100	11	52,4	100

In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse der beiden obigen Tabellen zusammenfassend dargestellt. Zu diesem Zweck wurde der mittlere Summenscore aus der jeweiligen Anzahl der positiven Befunde errechnet. Dabei wird deutlich, dass in keiner der drei Prüfgruppen signifikante Unterschiede hinsichtlich der Zahl der nicht-infizierten Probanden bestanden. Sowohl bei der zweiten als auch bei der dritten Gastroskopie war die mittlere Anzahl der positiven Befunde bei den drei Gruppen auf vergleichbarem Niveau; statistisch signifikante Unterschiede konnten nicht festgestellt werden

($p=0,148/H$ -Test). Es fanden sich ferner keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppen zwischen der zweiten und der dritten Kontroll-Gastroskopien. Dies bedeutet, dass sich die Anzahl der nicht-infizierten Probanden zwischen der zweiten und dritten Gastroskopie-Kontrolle nicht signifikant verändert hatte (Abb. 25).

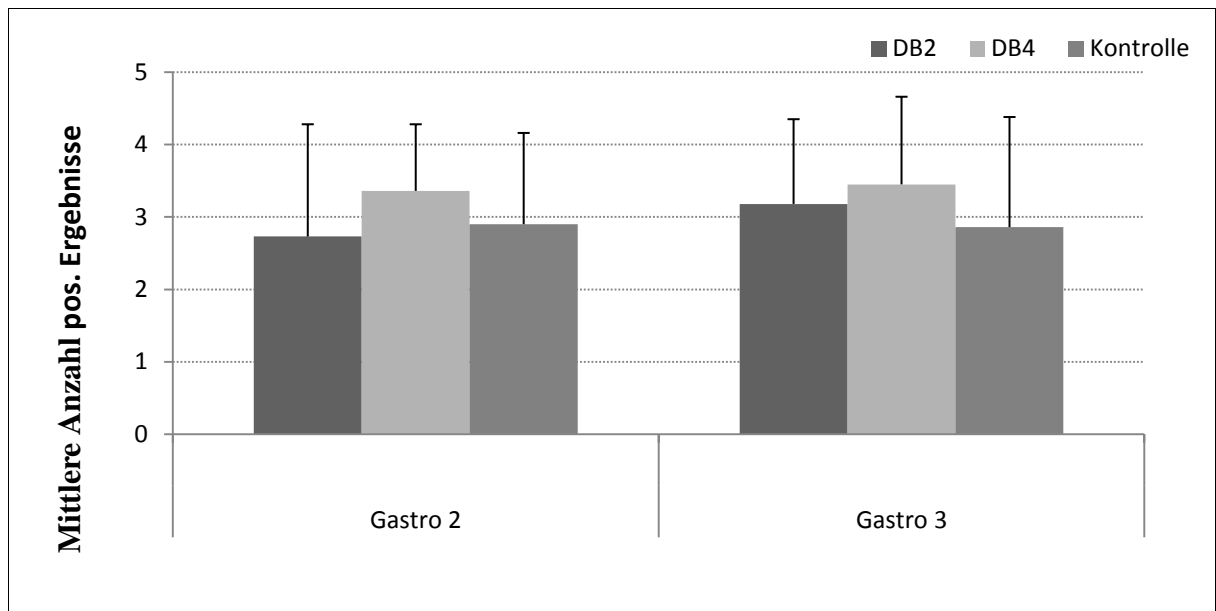


Abb. 25: Mittlerer Summenscore der positiven Ergebnisse aus WS, HUT, Atemtest und Kultur zum Zeitpunkt der 2. Gastroskopie und 3. Gastroskopie.

Keine signifikanten Abweichungen zwischen den Prüfgruppen / Kruskal-Wallis-Test. Gastro: Gastroskopie

3.5 Vergleich *H. pylori* negativen vs. *H. pylori* positiven Probanden

Wie weiter oben in den Abschnitten 3.1 (Konzentration der Zytokine in Biopsieüberständen), 3.2 (die Anzahl der FOXP3+ Zellen in Biopsien) und 3.3 (Histopathologische Befunde) gezeigt, hatten sich keine Unterschiede zwischen den drei Prüfgruppen (DB2, DB4, Kontrolle) erkennen lassen. Dennoch waren zum Zeitpunkt der zweiten und der dritten Gastroskopie einige wenige Probanden bezüglich des *H. pylori*-Befundes negativ, wie im obigen Abschnitt 3.4 dargestellt wurde.

Um zu prüfen, ob, unabhängig von der Prüfgruppe, Unterschiede zwischen *H. pylori* positiven und *H. pylori* negativen Probanden bestehen, wurden weitere statistische Analysen durchgeführt. Als *H. pylori* negative Probanden wurden alle Probanden eingeteilt, die zum Zeitpunkt der dritten Gastroskopie einen eindeutig negativen *H. pylori* Befund aufgewiesen hatten (Summenscore = 0). Insgesamt fanden sich vier *H. pylori* negative Probanden; drei gehörten der Kontrollgruppe, einer der Gruppe DB4 an (Tab.2).

In den folgenden Abschnitten sind die Konzentration von Zytokinen in Biopsieüberständen, die Anzahl der FOXP3+ T_{reg} Zellen und der histopathologische Befund in Abhängigkeit vom positiven oder negativen *H. pylori* Befund dargestellt. Ohne Ausnahme ergaben sich hierbei keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den *H. pylori* positiven (Nicht-Eradizierern) und *H. pylori* negativen Probanden (Eradizierern).

3.5.1 Vergleich der Zytokinsekretion zwischen *H. pylori* negativen und positiven Probanden

Hinsichtlich der Konzentrationen der Zytokine - INF γ , TNF α , IL-4 und IL-10, bestimmt aus Th-Zellen in Antrum und Duodenum, hatten sich in der statistischen Analyse im Wesentlichen keine signifikanten Unterschiede zwischen *H. pylori* positiven und negativen Probanden ergeben (Abb. 26-33).

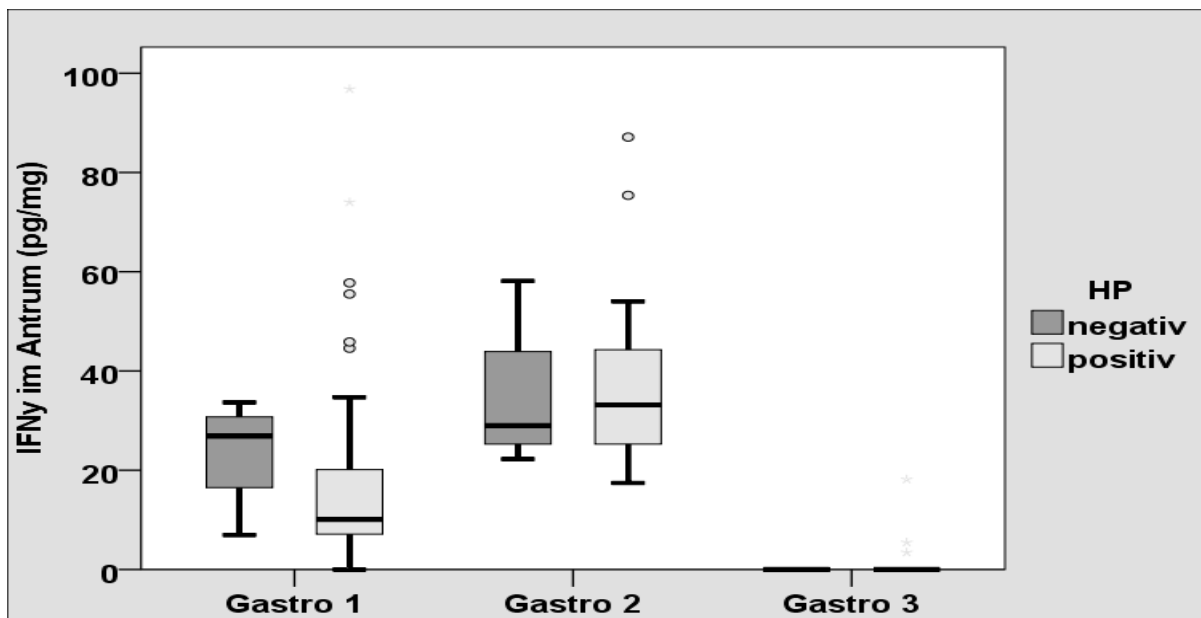


Abb. 26: Vergleich der INF γ -Konzentration zwischen den *H. pylori* negativen und positiven Probanden in den Antrum – Biopsien im Studienverlauf (zum Zeitpunkt der 1., 2. und 3. Gastroskopie). Mann-Whitney-U-Test: Keine signifikanten Unterschiede zwischen den *H. pylori* negativen und positiven Probanden.

Gastro: Gastroskopie

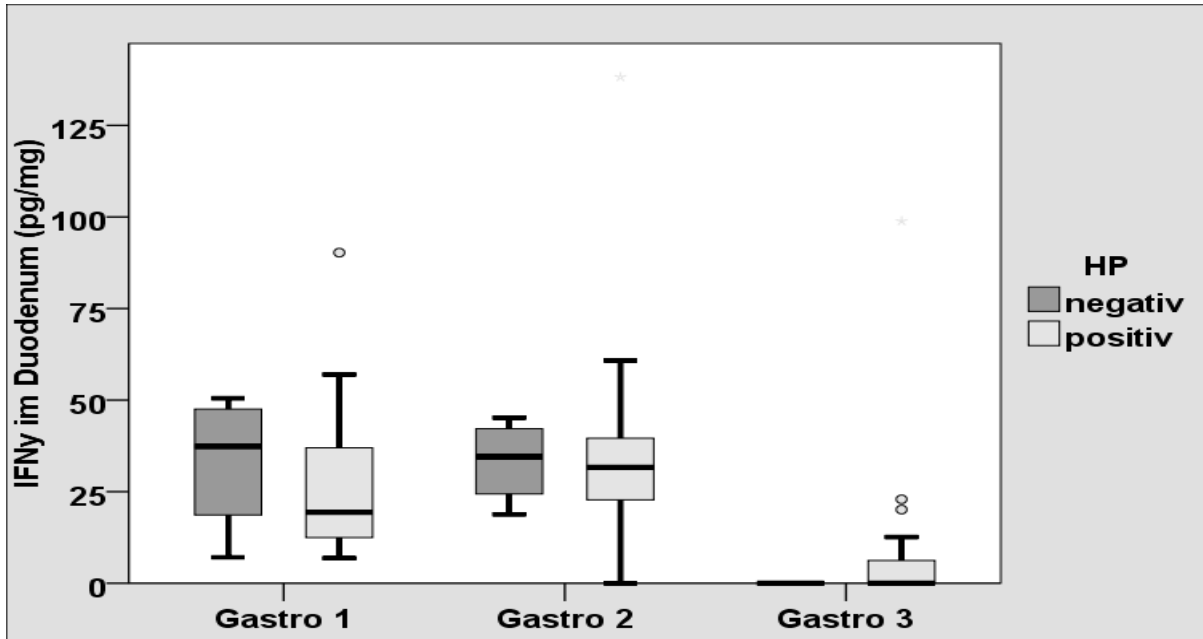


Abb. 27: Vergleich der IFN γ -Konzentration zwischen den *H. pylori* negativen und positiven Probanden in den Duodenum - Biopsien im Studienverlauf (zum Zeitpunkt der 1., 2. und 3. Gastroskopie). Mann-Whitney-U-Test: Keine signifikanten Unterschiede zwischen den *H. pylori* negativen und positiven Probanden.

Gastro: Gastroskopie

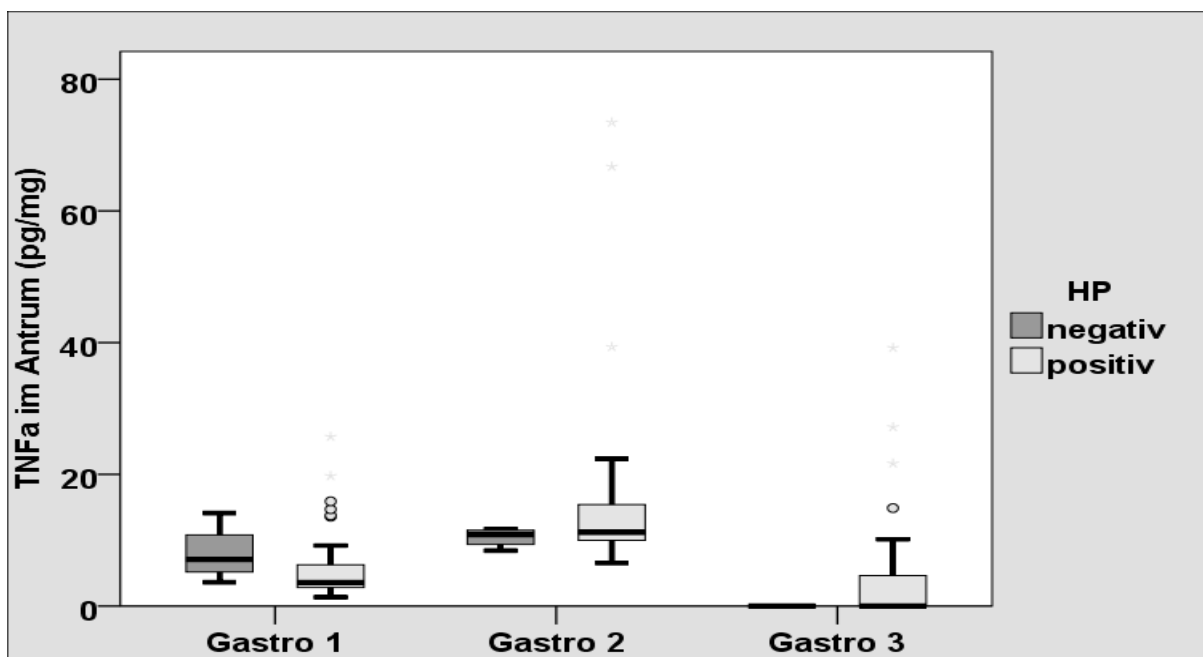


Abb. 28: Vergleich der TNF α -Konzentration zwischen den *H. pylori* negativen und positiven Probanden in den Antrum – Biopsien im Studienverlauf (zum Zeitpunkt der 1., 2. und 3. Gastroskopie). Mann-Whitney-U-Test: Keine signifikanten Unterschiede zwischen den *H. pylori* negativen und positiven Probanden. Gastro: Gastroskopie

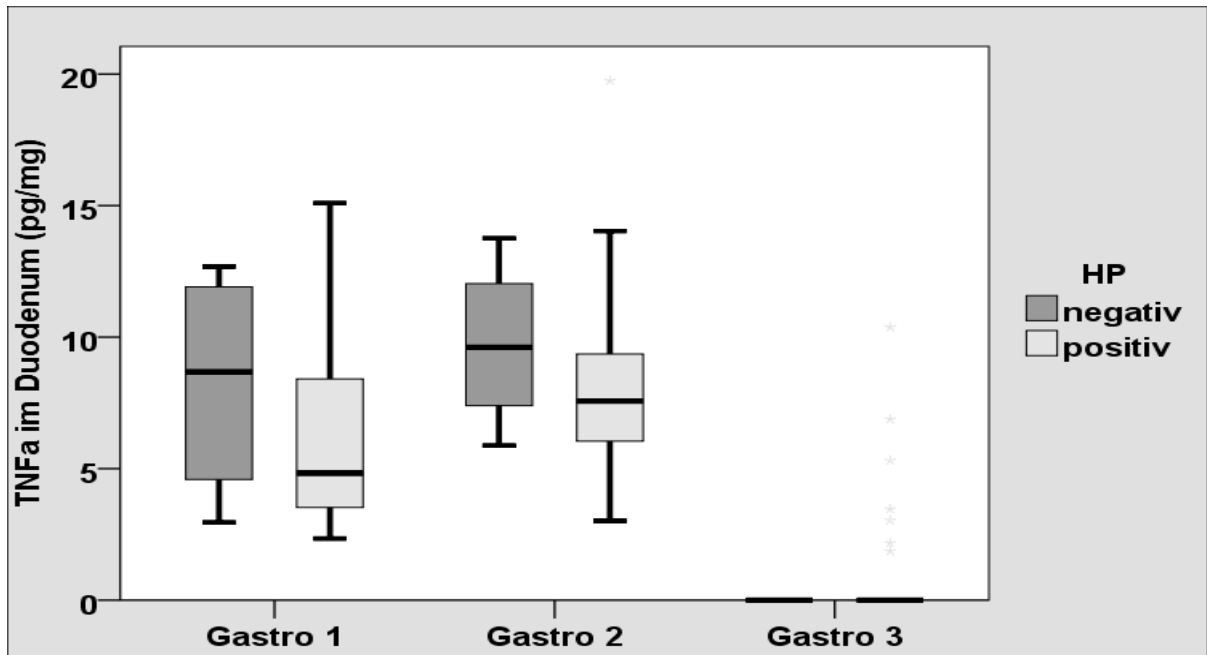


Abb. 29: Vergleich der TNF α -Konzentration zwischen den *H. pylori* negativen und positiven Probanden in den Duodenum – Biopsien im Studienverlauf (zum Zeitpunkt der 1., 2. und 3. Gastroskopie). Mann-Whitney-U-Test: Keine signifikanten Unterschiede zwischen den *H. pylori* negativen und positiven Probanden. Gastro: Gastroskopie

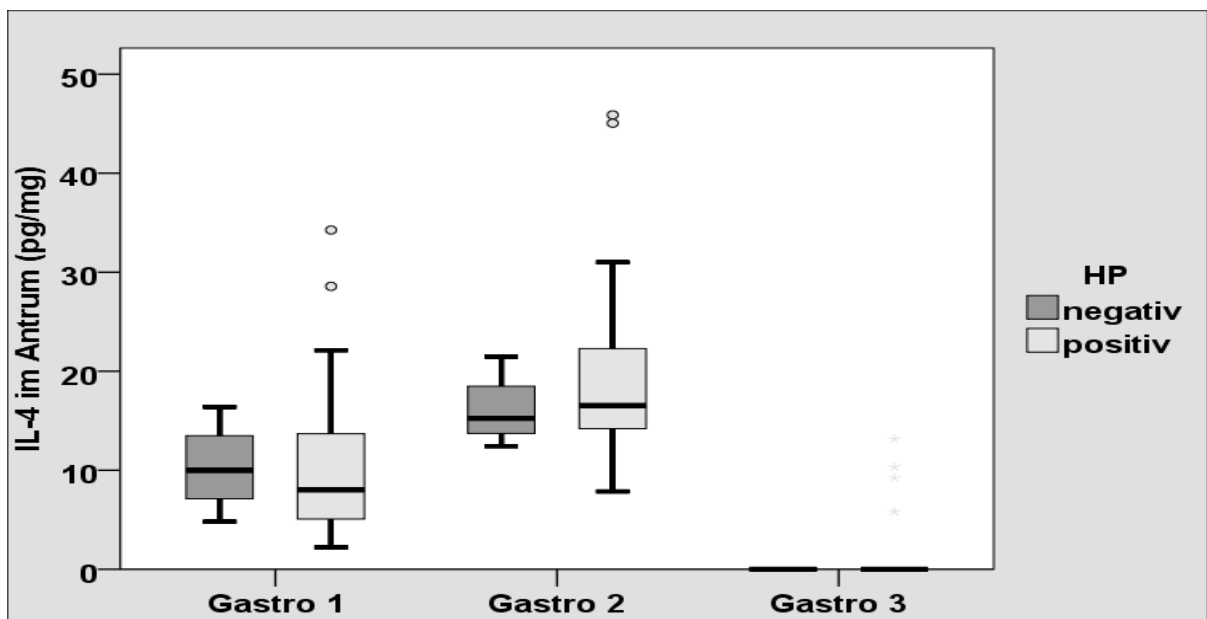


Abb. 30: Vergleich der IL-4-Konzentration zwischen den *H. pylori* negativen und positiven Probanden in den Antrum – Biopsien im Studienverlauf (zum Zeitpunkt der 1., 2. und 3. Gastroskopie). Mann-Whitney-U-Test: Keine signifikanten Unterschiede zwischen den *H. pylori* negativen und positiven Probanden. Gastro: Gastroskopie

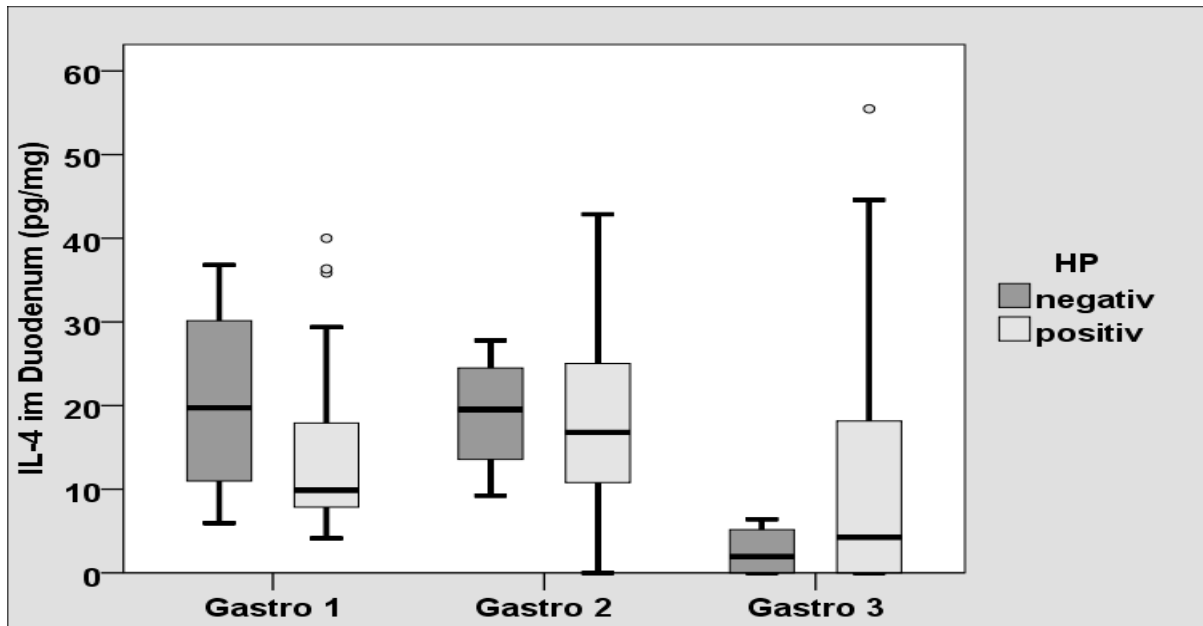


Abb. 31: Vergleich der IL-4-Konzentration zwischen den *H. pylori* negativen und positiven Probanden in den Duodenum – Biopsien im Studienverlauf (zum Zeitpunkt der 1., 2. und 3. Gastroskopie). Mann-Whitney-U-Test: Keine signifikanten Unterschiede zwischen den *H. pylori* negativen und positiven Probanden. Gastro: Gastroskopie

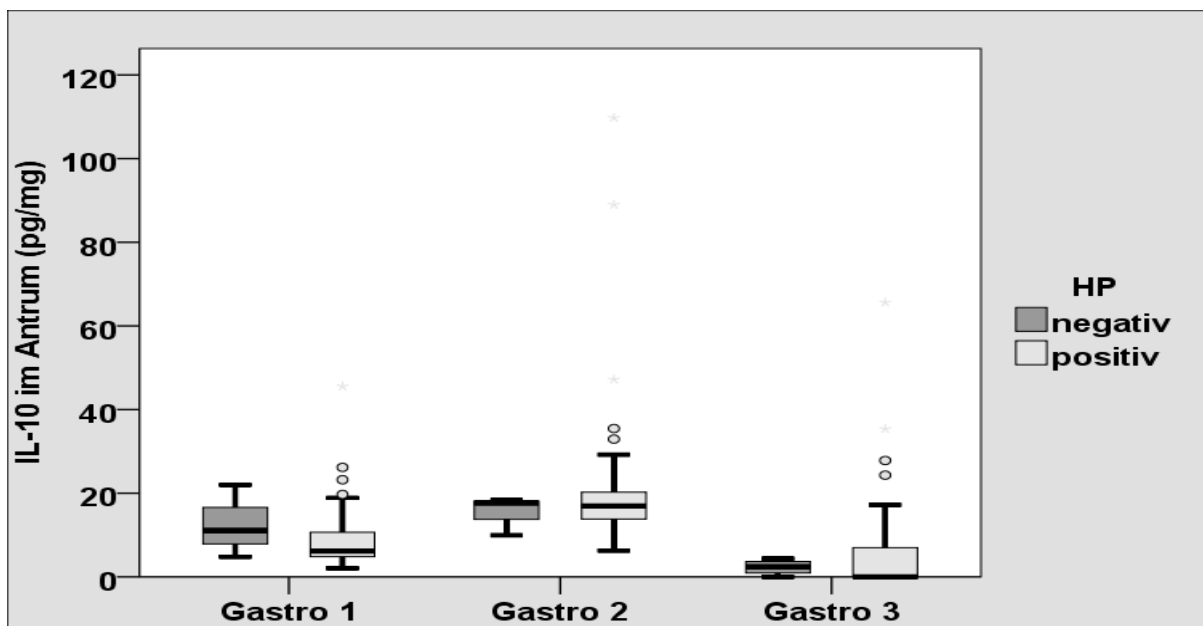


Abb. 32: Vergleich der IL-10-Konzentration zwischen den *H. pylori* negativen und positiven Probanden in den Antrum – Biopsien im Studienverlauf (zum Zeitpunkt der 1., 2. und 3. Gastroskopie). Mann-Whitney-U-Test: Keine signifikanten Unterschiede zwischen den *H. pylori* negativen und positiven Probanden. Gastro: Gastroskopie

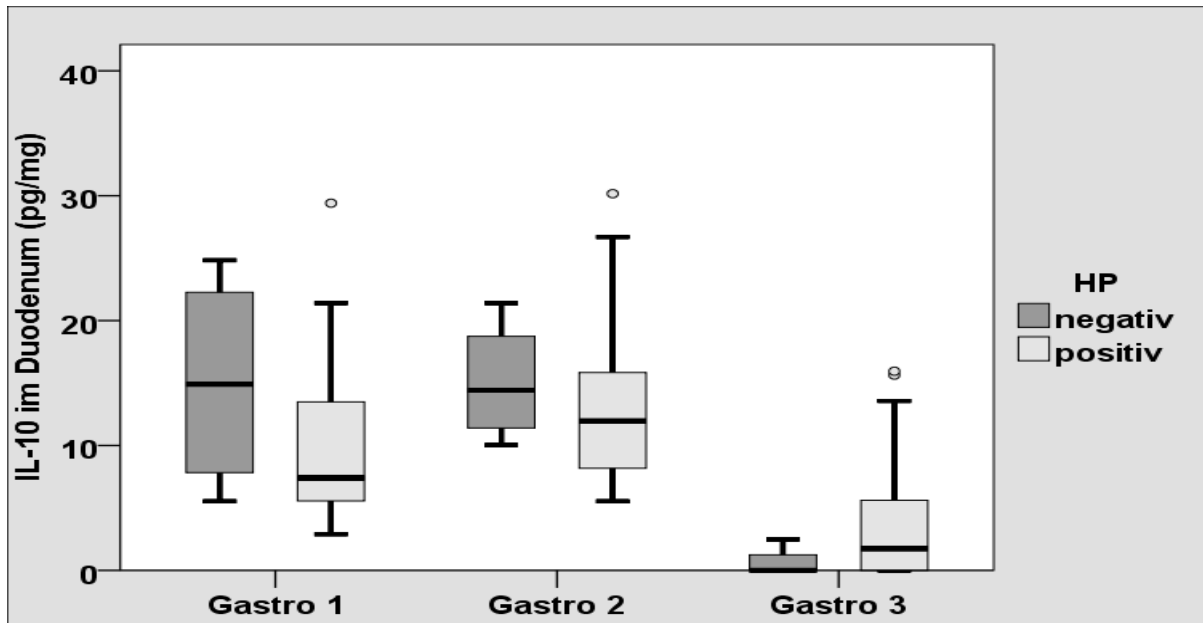


Abb. 33: Vergleich der IL-10-Konzentration zwischen den *H. pylori* negativen und positiven Probanden in den Duodenum - Biopsien im Studienverlauf (zum Zeitpunkt der 1., 2. und 3. Gastroskopie), Mann-Whitney-U-Test: Keine signifikanten Unterschiede zwischen den *H. pylori* negativen und positiven Probanden. Gastro: Gastroskopie

3.5.2 Vergleich der Anzahl der FOXP3+ T_{reg} Zellen in Biopsien zwischen den *H. pylori* negativen und positiven Probanden

Hinsichtlich der Anzahl der FOXP3+ Zellen fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der *H. pylori* negativen Probandengruppe und der *H. pylori* positiven Probandengruppe.

Im Antrum zeigte sich zum Zeitpunkt der 2. Gastroskopie eine etwas höhere Anzahl der FOXP3+ Zellen bei den *H. pylori* negativen Probanden (Eradizierern) als bei den *H. pylori* positiven Probanden (Nicht – Eradizierern), jedoch in der statistischen Auswertung ohne Signifikanz (Abb. 34).

Im Duodenum zeigte sich ein anderes Bild: Deskriptiv betrachtet war bei den *H. pylori* negativen Probanden (Eradizierern) die Anzahl der FOXP3+ Zellen im Duodenum sowohl bei der 2. Gastroskopie als auch bei der 3. Gastroskopie etwas niedriger (Abb. 35).

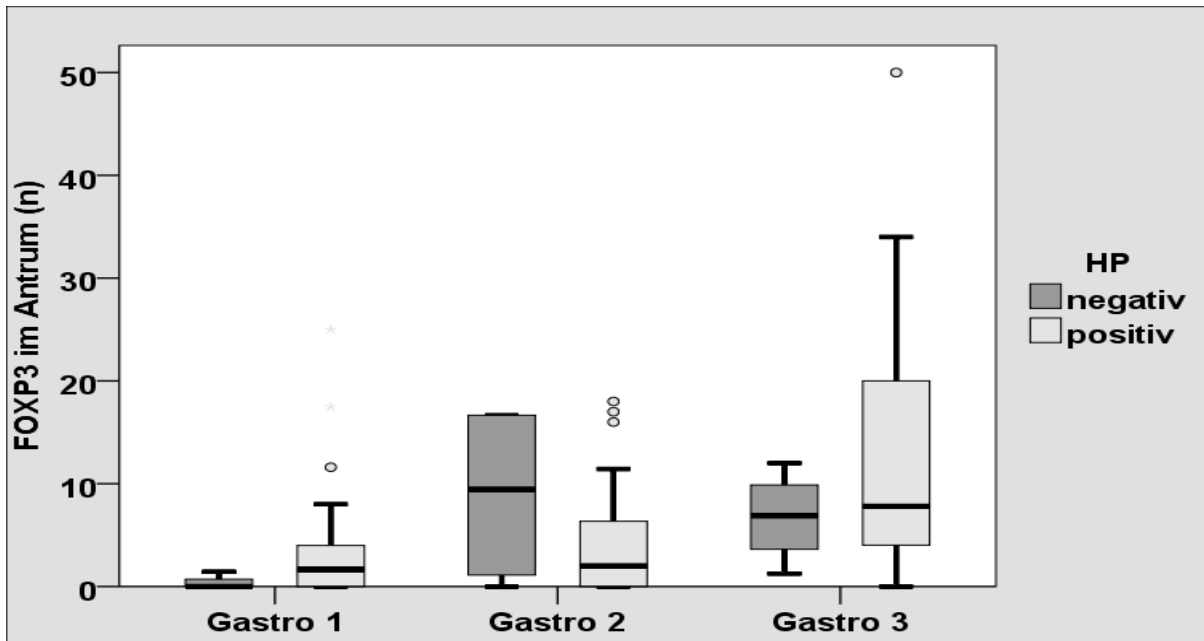


Abb. 34: Vergleich der Anzahl (n/10HPF) der FOXP3+ Zellen in den Antrum-Biopsien zwischen den *H. pylori* negativen und positiven Probanden im Studienverlauf (zum Zeitpunkt der 1., 2. und 3. Gastroskopie). Mann-Whitney-U-Test: Keine signifikanten Unterschiede zwischen den *H. pylori* negativen und positiven Probanden. Gastro: Gastroskopie

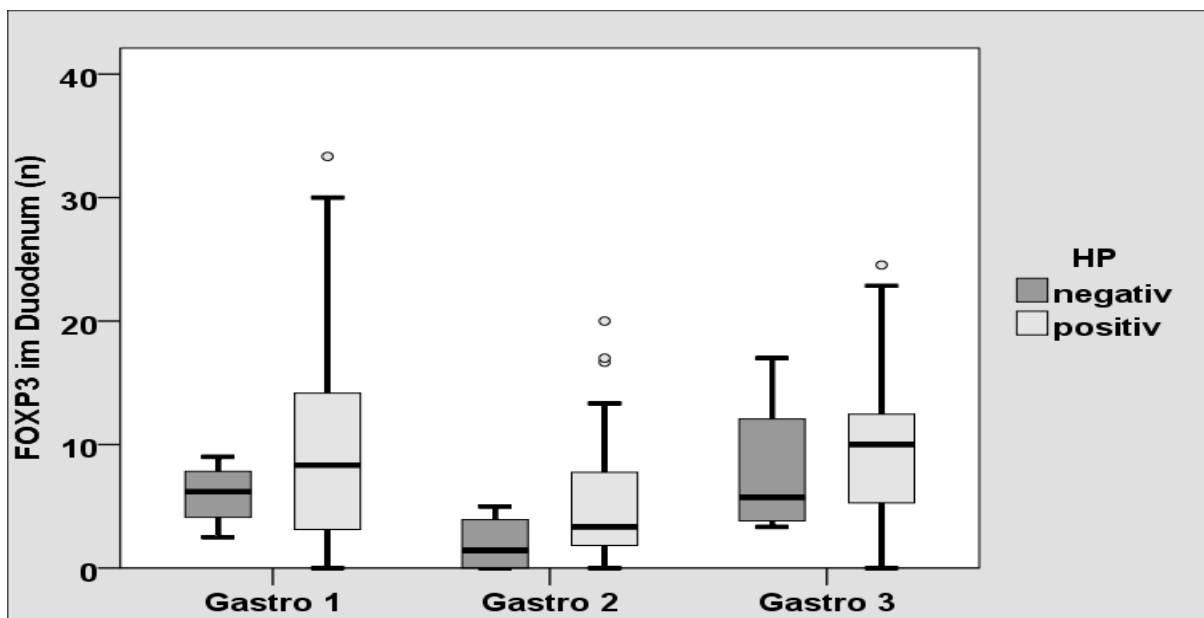


Abb. 35: Vergleich der Anzahl (n/10HPF) der FOXP3+ Zellen zwischen den *H. pylori* negativen und positiven Probanden in den Duodenum – Biopsien im Studienverlauf (zum Zeitpunkt der 1., 2. und 3. Gastroskopie). Mann-Whitney-U-Test: Keine signifikanten Unterschiede zwischen den *H. pylori* negativen und positiven Probanden. Gastro: Gastroskopie

Die Abbildungen 36 und 37 zeigen die immunhistochemische FOXP3 – Färbung exemplarisch vom Proband 90 aus der Gruppe der Eradizierer und vom Proband 16 aus der Gruppe der Nicht-Eradizierer.

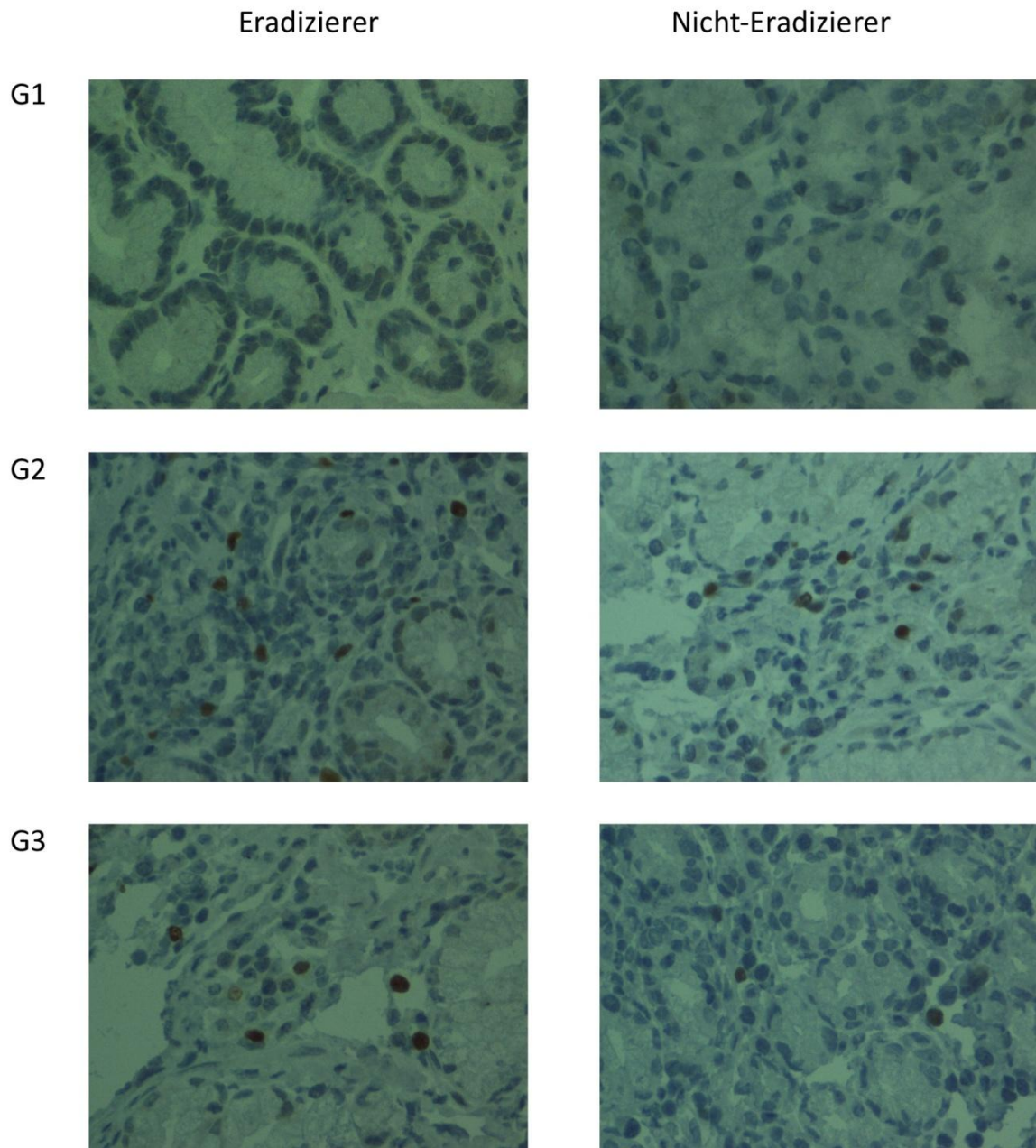


Abb. 36: FOXP3+ Zellen (braungefärbt) in FOXP3 – Färbung, Antrum-Biopsien unter 400 facher Vergrößerung (fotografiert mit Olympus DP20 microscope camera).

Aus der Eradizierer - Gruppe Proband 90 und aus der Nicht Eradizierer – Gruppe Proband 16.

G1: Gastroskopie 1, G2: Gastroskopie 2, G3: Gastroskopie 3

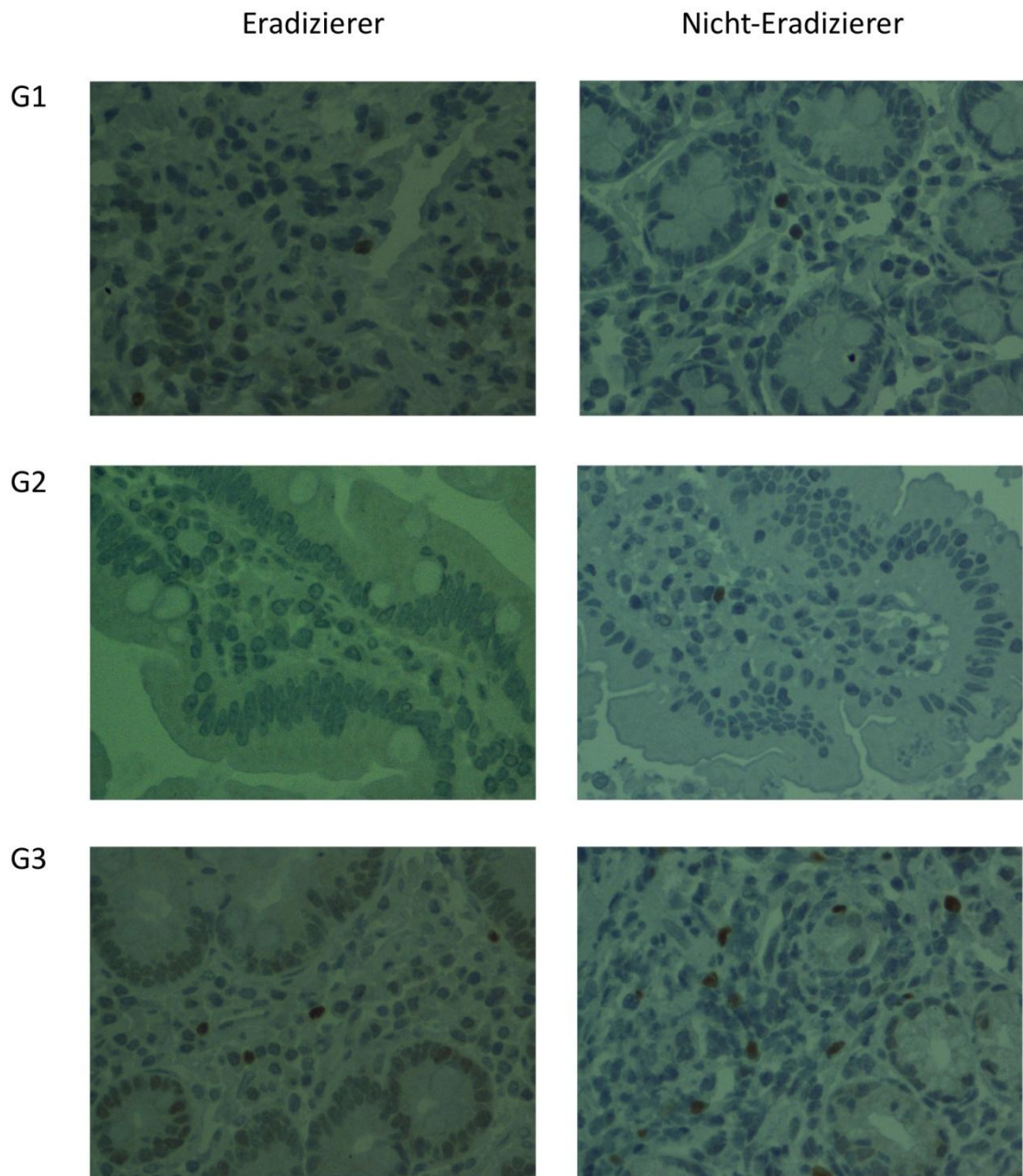


Abb. 37: FOXP3+ Zellen (braunefärbt) in FOXP3 – Färbung, Duodenum-Biopsien unter 400 facher Vergrößerung (fotografiert mit Olympus DP20 microscope camera).

Aus der Eradizierer - Gruppe Proband 90 und aus der Nicht Eradizierer – Gruppe Proband 16.

G1: Gastroskopie 1, G2: Gastroskopie 2, G3: Gastroskopie 3

3.5.3 Vergleich der histopathologischen Befunde zwischen den *H. pylori* negativen und positiven Probanden (Extern erhobene Befunde)

Zum Zweck dieser Analyse wurde der histopathologische Summenscore aus vier Einzelparametern (lymphoide Infiltration, die neutrophile Infiltration, die epitheliale Regeneration und der Mukosa-Abbau) herangezogen (Vergleich Abschnitt 3.3). Signifikante Unterschiede zwischen *H. pylori* positiven und *H. pylori* negativen Probanden konnten nicht festgestellt werden (Abb. 38-39).

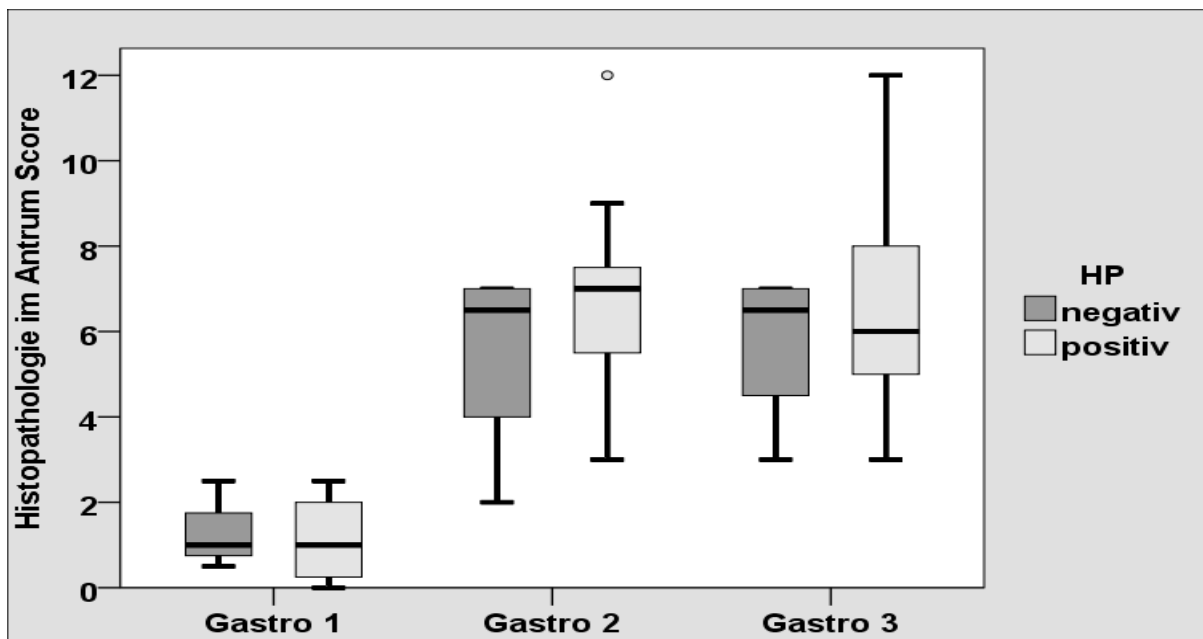


Abb. 38: Vergleich der Histopathologie-Summenscores zwischen den *H. pylori* negativen und positiven Probanden in den Antrum – Biopsien im Studienverlauf (zum Zeitpunkt der 1., 2. und 3. Gastroskopie). Mann-Whitney-U-Test: Keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den *H. pylori* negativen und positiven Probanden. Gastro: Gastroskopie

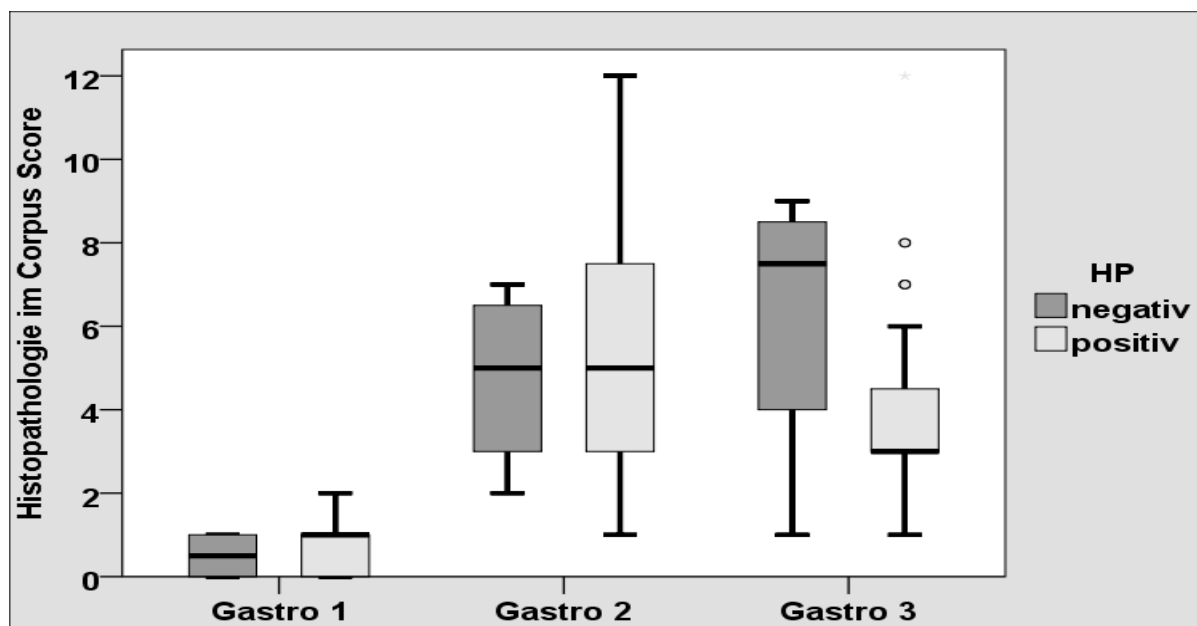


Abb. 39: Vergleich der Histopathologie-Summscores zwischen den *H. pylori* negativen und positiven Probanden in den Corpus – Biopsien im Studienverlauf (zum Zeitpunkt der 1., 2. und 3. Gastroskopie). Mann-Whitney-U-Test: Keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den *H. pylori* negativen und positiven Probanden. Gastro: Gastroskopie

3.6 Darstellung einzelner *H. pylori* negativer Probanden

Im Folgenden sind die Ergebnisse einzelner *H. pylori* negativer Probanden dargestellt. Ausgewählt wurden zu diesem Zweck alle Probanden, die zum Zeitpunkt der dritten Gastroskopie einen eindeutig negativen *H. pylori* Befund aufgewiesen hatten (Summscore = 0). Insgesamt fanden sich vier *H. pylori* negative Probanden; drei gehörten der Kontrollgruppe, einer der Gruppe DB4 an (Tab. 3).

Tab. 3: Darstellung der einzelnen Probanden mit eindeutig negativem *H. pylori* Befund bei der dritten Gastroskopie. (Basis: negativer Befund im Antrum und Corpus mittels WS, HUT, Atemtest, Kultur).

Pat.-Nr.	Gruppe	<i>H. pylori</i> - Score Gastr	<i>H. pylori</i> - Score Gastr
18	Kontrolle	2	0
90	Kontrolle	1	0
104	Kontrolle	0	0
107	DB4	1	0

In den folgenden Abbildungen ist der Verlauf der *H. pylori* negativen Probanden dargestellt. Als Vergleich wurde jeweils der Mittelwert der *H. pylori* positiven Probanden mit angegeben. Bei diesem Vergleich wurde sich auf die Ergebnisse der Antrum-Biopsien beschränkt.

3.6.1 Vergleich der Zytokinsekretion in Biopsieüberständen zwischen den *H. pylori* positiven und einzelnen *H. pylori* negativen Probanden

Wie aus den folgenden Grafiken ersichtlich wird, hatten sich keine eindeutigen Trends ergeben, die erkennen ließen, dass *H. pylori* negative Probanden im Vergleich mit den *H. pylori* positiven eher hohe oder niedrige Konzentration der Zytokine aufwiesen (Abb. 40 - 47).

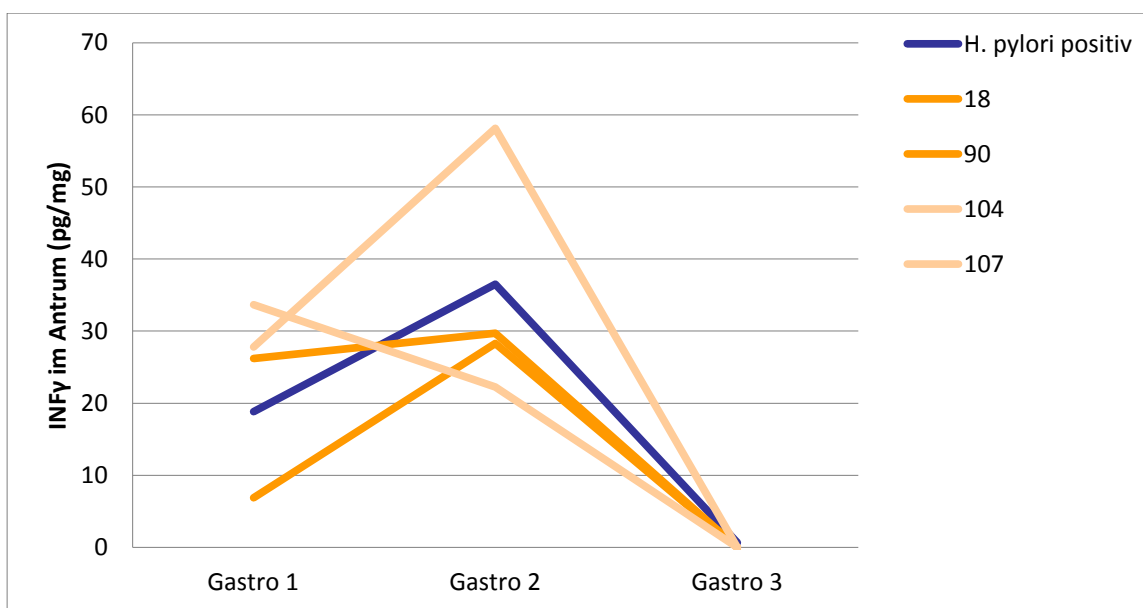


Abb. 40: Vergleich der $\text{INF}\gamma$ – Konzentration in den Antrum-Biopsien zwischen den *H. pylori* positiven Probanden und einzelnen *H. pylori* negativen Probanden (zum Zeitpunkt der 1., 2. und 3. Gastroskopie). *H. pylori* positive Probanden sind als Mittelwert dargestellt; bei den vier Probanden handelt es sich um Einzelwerte. Gastro: Gastroskopie

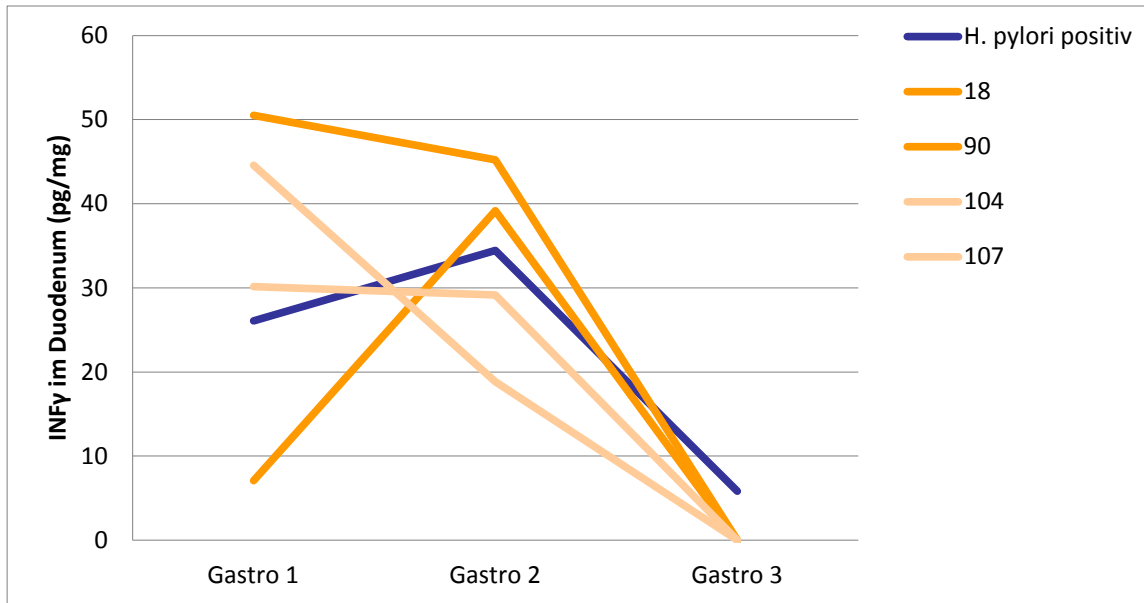


Abb. 41: Vergleich der IFN γ – Konzentration in den Duodenum-Biopsien zwischen den *H. pylori* positiven Probanden und einzelnen *H. pylori* negativen Probanden (zum Zeitpunkt der 1., 2. und 3. Gastroskopie). *H. pylori* positive Probanden sind als Mittelwert dargestellt; bei den vier Probanden handelt es sich um Einzelwerte. Gastro: Gastroskopie

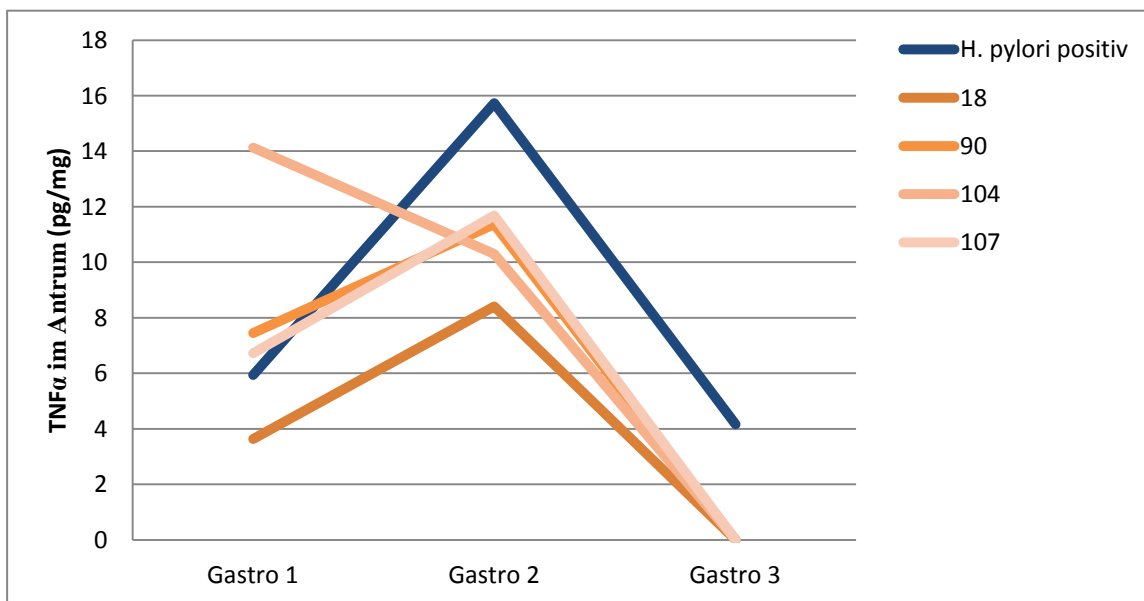


Abb. 42: Vergleich der TNF α – Konzentration in den Antrum-Biopsien zwischen den *H. pylori* positiven Probanden und einzelnen *H. pylori* negativen Probanden (zum Zeitpunkt der 1., 2. und 3. Gastroskopie). *H. pylori* positive Probanden sind als Mittelwert dargestellt; bei den vier Probanden handelt es sich um Einzelwerte. Gastro: Gastroskopie

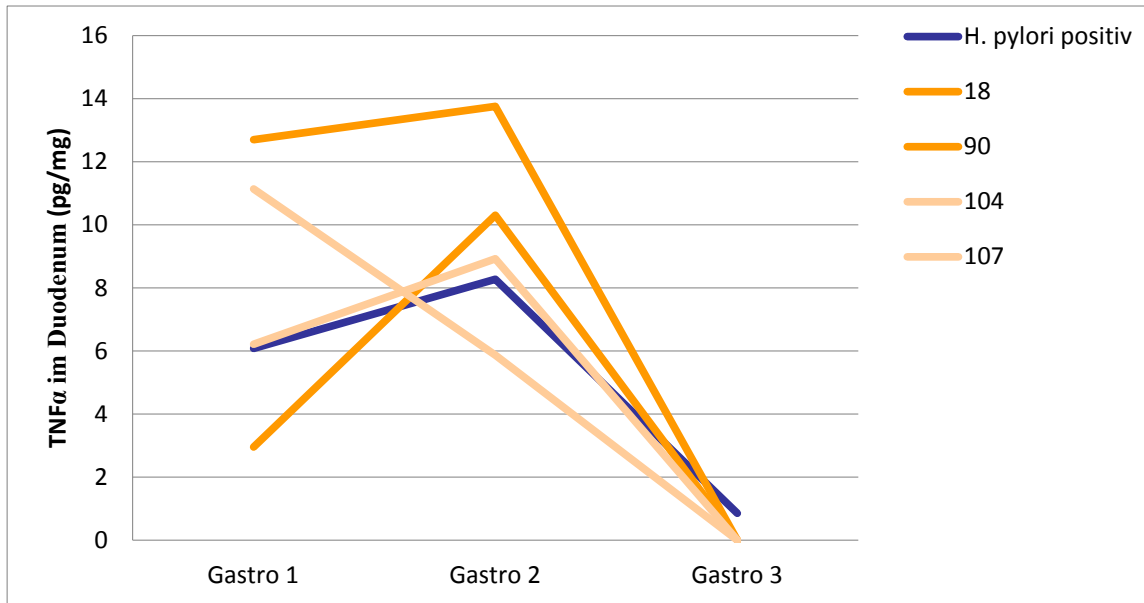


Abb. 43: Vergleich der TNF α – Konzentration in den Duodenum-Biopsien zwischen den *H. pylori* positiven Probanden und einzelnen *H. pylori* negativen Probanden (zum Zeitpunkt der 1., 2. und 3. Gastroskopie). *H. pylori* positive Probanden sind als Mittelwert dargestellt; bei den vier Probanden handelt es sich um Einzelwerte. Gastro: Gastroskopie

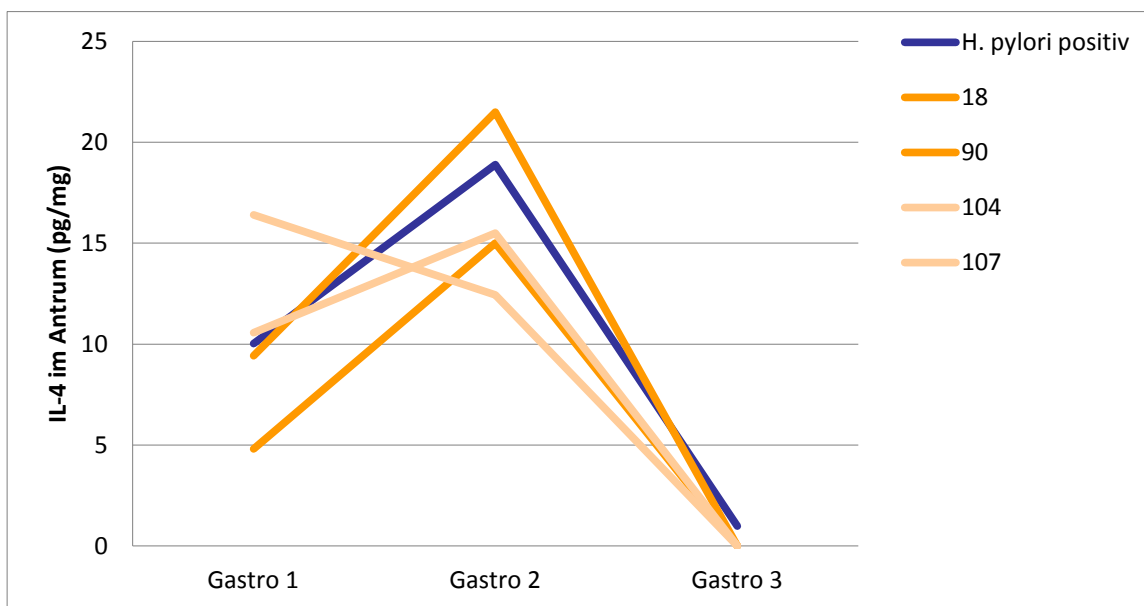


Abb. 44: Vergleich der IL-4 – Konzentration in den Antrum-Biopsien zwischen den *H. pylori* positiven Probanden und einzelnen *H. pylori* negativen Probanden (zum Zeitpunkt der 1., 2. und 3. Gastroskopie). *H. pylori* positive Probanden sind als Mittelwert dargestellt; bei den vier Probanden handelt es sich um Einzelwerte. Gastro: Gastroskopie

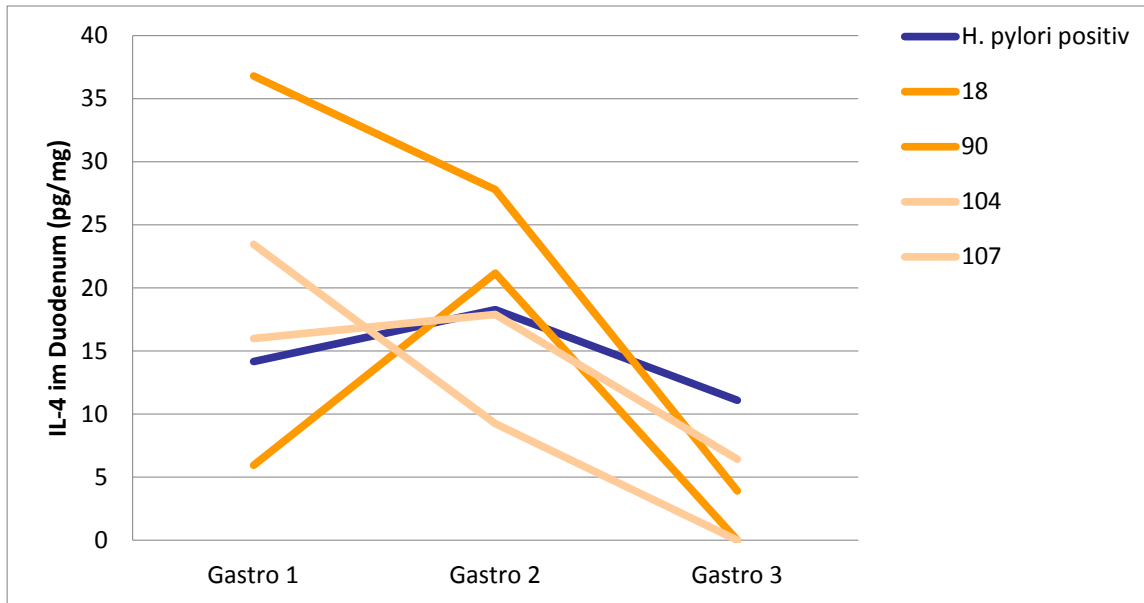


Abb. 45: Vergleich der IL-4 – Konzentration in den Duodenum-Biopsien zwischen den *H. pylori* positiven Probanden und einzelnen *H. pylori* negativen Probanden (zum Zeitpunkt der 1., 2. und 3. Gastroskopie). *H. pylori* positive Probanden sind als Mittelwert dargestellt; bei den vier Probanden handelt es sich um Einzelwerte. Gastro: Gastroskopie

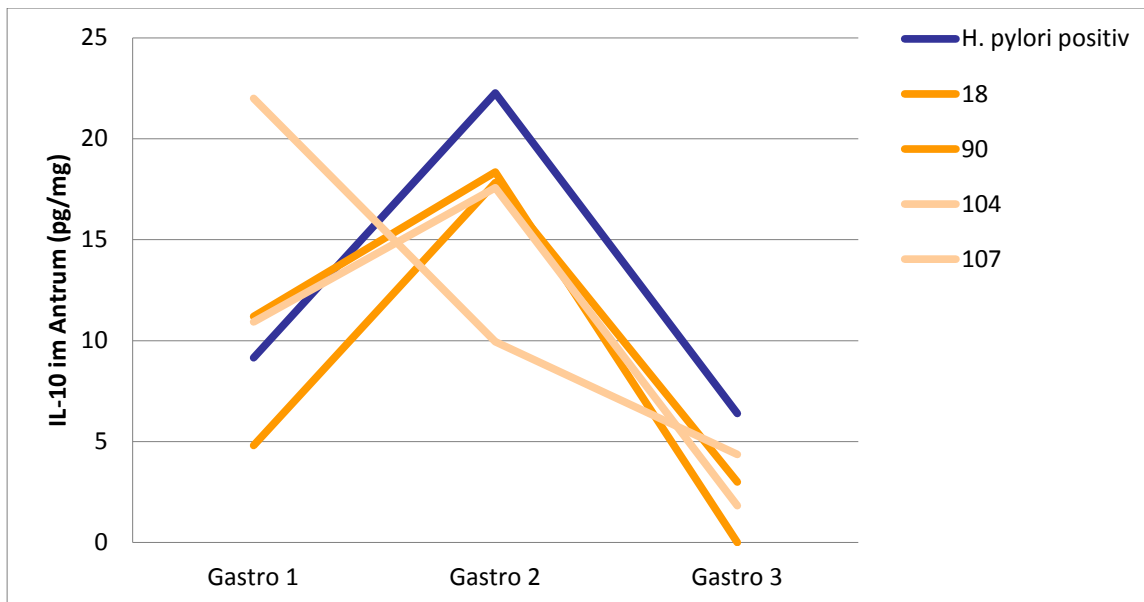


Abb. 46: Vergleich der IL-10 – Konzentration in den Antrum-Biopsien zwischen den *H. pylori* positiven Probanden und einzelnen *H. pylori* negativen Probanden (zum Zeitpunkt der 1., 2. und 3. Gastroskopie). *H. pylori* positive Probanden sind als Mittelwert dargestellt; bei den vier Probanden handelt es sich um Einzelwerte. Gastro: Gastroskopie

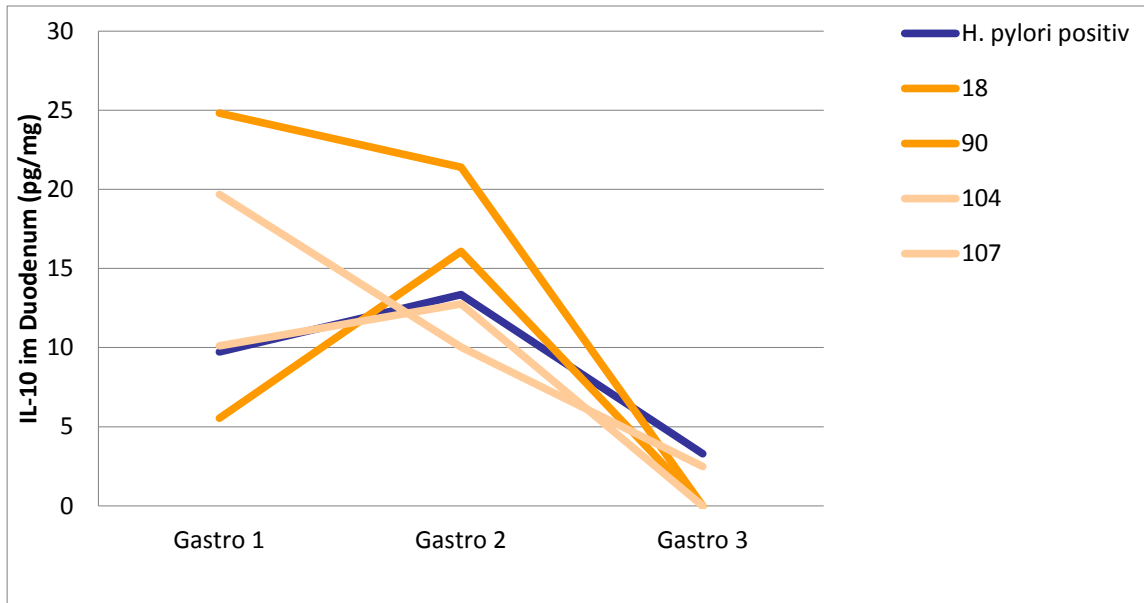


Abb. 47: Vergleich der IL-10 – Konzentration in den Duodenum-Biopsien zwischen den *H. pylori* positiven Probanden und einzelnen *H. pylori* negativen Probanden (zum Zeitpunkt der 1., 2. und 3. Gastroskopie). *H. pylori* positive Probanden sind als Mittelwert dargestellt; bei den vier Probanden handelt es sich um Einzelwerte. Gastro: Gastroskopie

3.6.2 Vergleich der Anzahl der FOXP3+ Zellen von *H. pylori* negativen und positiven Probanden

In Bezug auf die Anzahl der FOXP3+ Zellen ergaben sich deutliche Abweichungen vom Mittelwert der *H. pylori* positiven Probanden, die jedoch in der statistischen Analyse nicht signifikant waren. Zwar fanden sich in den Antrum-Biopsien von zwei Probanden in der 2. Gastroskopie deutlich nach oben hin abweichende Befunde, jedoch lag bei den beiden anderen *H. pylori* negativen Probanden die Zellzahl unterhalb des Mittelwertes der *H. pylori* positiven Probanden. In der 3. Gastroskopie ließ sich eine Tendenz zur niedrigen Expression der FOXP3+ T_{reg} Zellen bei den meisten *H. pylori* negativen Probanden erkennen (Abb. 48).

In den Duodenum-Biopsien lag bei den *H. pylori* negativen Probanden die Anzahl der FOXP3+ Zellen sowohl bei der 2. Gastroskopie als auch bei der 3. Gastroskopie, mit einer Ausnahme von einem Probanden, ebenfalls etwas niedriger als der Mittelwert der *H. Pylori* positiven Probanden (Abb. 49).

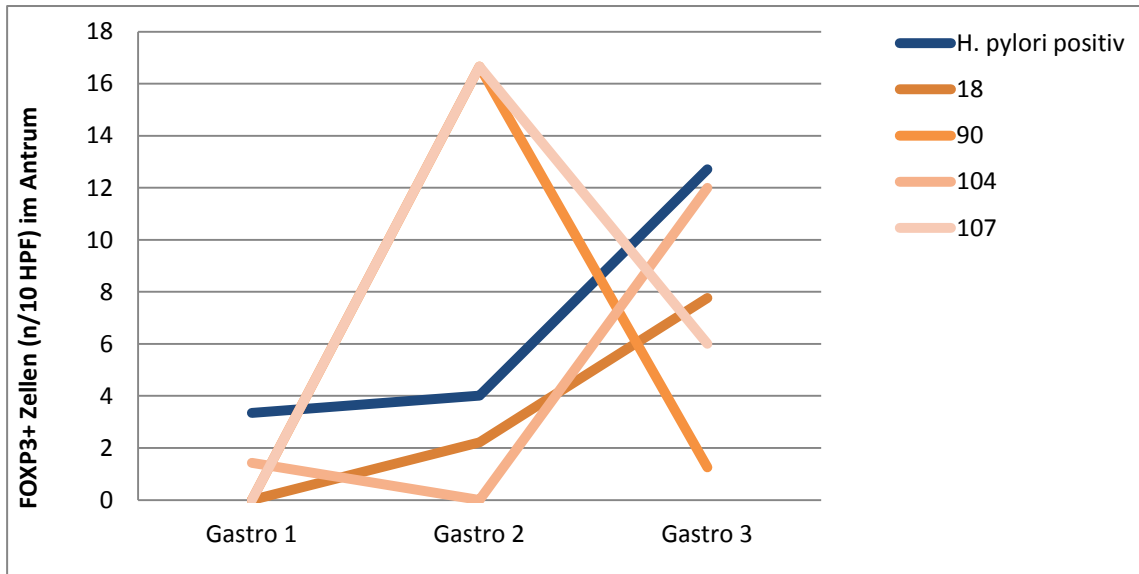


Abb. 48: Vergleich der Anzahl (n/10 HPF) der FOXP3+ Zellen in den Antrum-Biopsien zwischen den *H. pylori* positiven Probanden und einzelnen *H. pylori* negativen Probanden (zum Zeitpunkt der 1., 2. und 3. Gastroskopie). *H. pylori* positive Probanden sind als Mittelwert dargestellt; bei den vier Probanden handelt es sich um Einzelwerte. Gastro: Gastroskopie

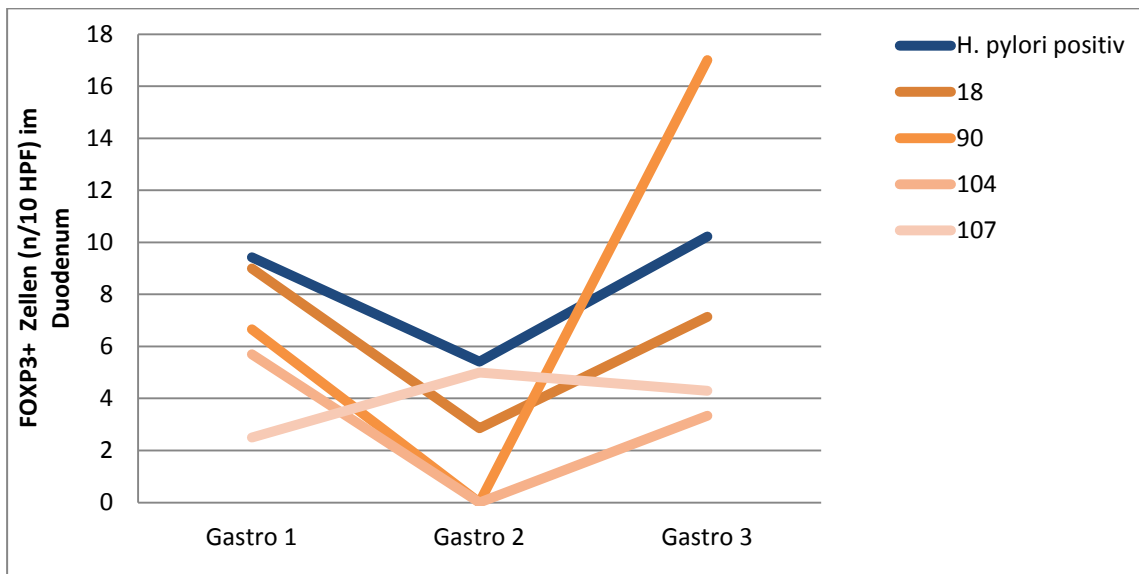


Abb. 49: Vergleich der Anzahl (n/10 HPF) der FOXP3+ Zellen in den Duodenum-Biopsien zwischen den *H. pylori* positiven Probanden und einzelnen *H. pylori* negativen Probanden (zum Zeitpunkt der 1., 2. und 3. Gastroskopie). *H. pylori* positive Probanden sind als Mittelwert dargestellt; bei den vier Probanden handelt es sich um Einzelwerte. Gastro: Gastroskopie

3.6.3 Vergleich der Histopathologischen Befunde von *H. pylori* negativen und positiven Probanden (extern erhobene Befunde)

In Bezug auf den histopathologischen Befund (Summenscore) hatten sich ebenfalls keine relevanten Abweichungen zwischen den vier Probanden mit negativem *H. pylori* Befund und dem Mittelwert

der *H. pylori* positiven Probanden ergeben. Lediglich der Proband 107 zeigte einen abweichenden Verlauf. Bei den übrigen drei Probanden entsprach der Grad der entzündlichen Veränderungen dem Befund der *H. pylori* positiven Probanden (Abb. 50).

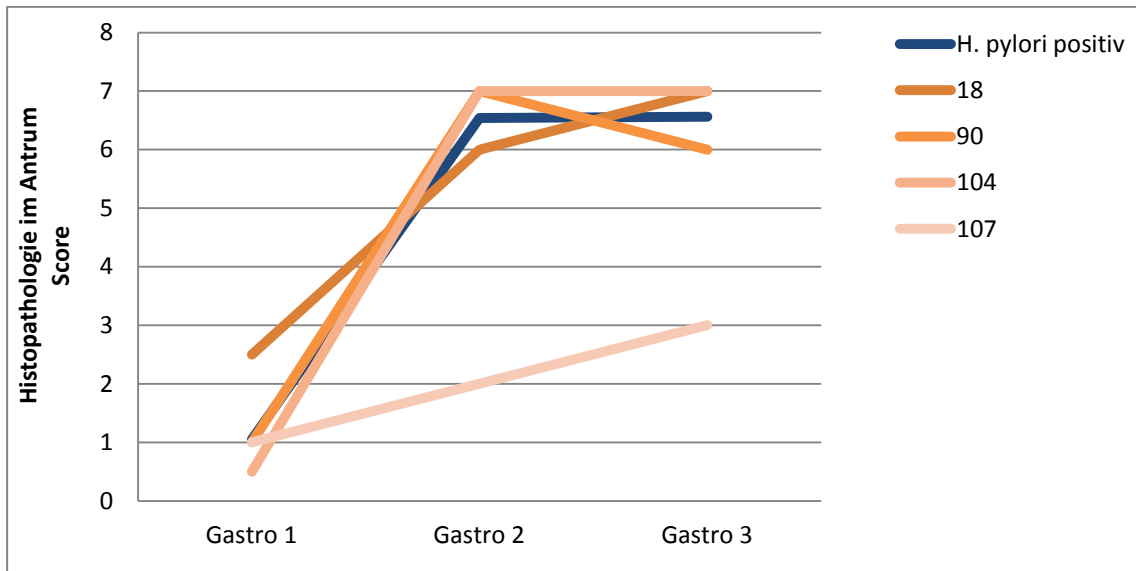


Abb. 50: Vergleich der Histopathologie-Summscores in den Antrum-Biopsien zwischen den *H. pylori* positiven Probanden und einzelnen *H. pylori* negativen Probanden (zum Zeitpunkt der 1., 2. und 3. Gastroskopie). *H. pylori* positive Probanden sind als Mittelwert dargestellt; bei den vier Probanden handelt es sich um Einzelwerte. Gastro: Gastroskopie

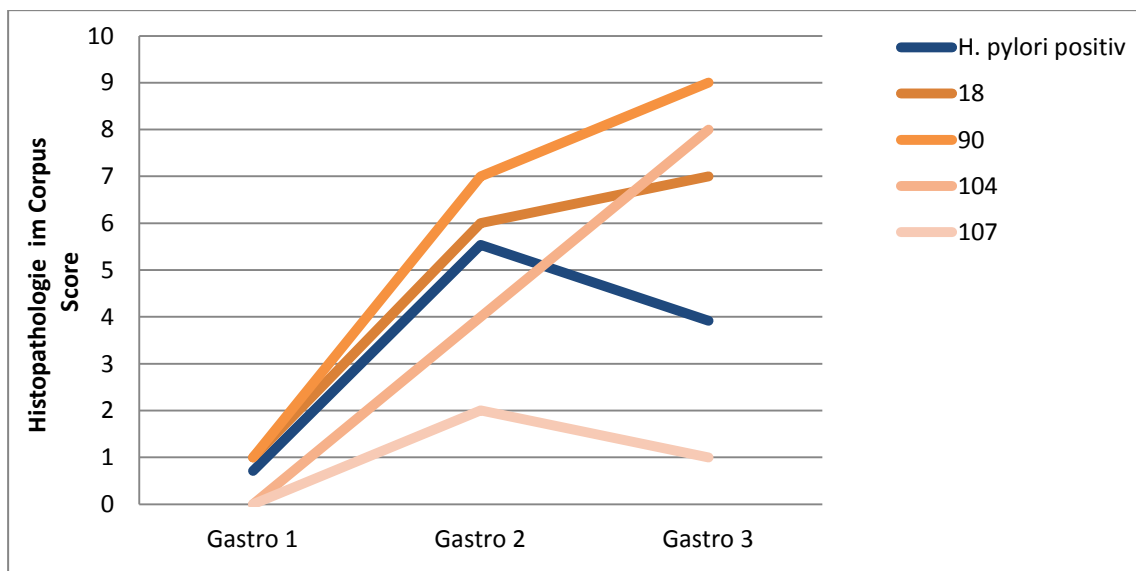


Abb. 51: Vergleich der Histopathologie-Summscores in den Corpus-Biopsien zwischen den *H. pylori* positiven Probanden und einzelnen *H. pylori* negativen Probanden (zum Zeitpunkt der 1., 2. und 3. Gastroskopie). *H. pylori* positive Probanden sind als Mittelwert dargestellt; bei den vier Probanden handelt es sich um Einzelwerte. Gastro: Gastroskopie

4 Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer prophylaktischen Vaccinierung auf das Zytokinmuster, die T_{reg} und die Histopathologie des Gastrointestinaltraktes nach Exposition gegenüber *H. pylori* untersucht.

Als Adjuvans des Impfstoffs diente *Salmonella* Serovar Typhi 21a, Typhoral® L, eine orale Lebendvaccine gegen Typhus. Untersucht wurden der *H. pylori* Urease A/B exprimierende Impfstoff (DB2) und der ein *H. pylori* spezifisches Antigen HP0231 exprimierende Impfstoff DB4. Die Kontrollgruppe erhielt nur Adjuvans. Die Sicherheit und Wirksamkeit der Impfstoffe waren in den präklinischen und klinischen Vorgängerstudien nachgewiesen worden [108-110].

Es wurden zahlreiche präklinische Studien für Impfstoffkandidaten gegen *H. pylori*, mit vielversprechenden Ergebnissen, veröffentlicht [93-99]. Demgegenüber wurden jedoch nur wenige klinische Wirksamkeitsstudien durchgeführt: Darunter waren Studien mit Urease-basierten Impfstoffen, entweder als gereinigtes rekombinantes Protein zusammen mit mukosalen Adjuvantien verabreicht mit Cholera-toxin als Adjuvans [99] oder auf der Basis eines Impfstoffes genetisch veränderter Salmonellen [113]. Die Ergebnisse zeigten nur eine begrenzte Immunogenität und eine schlechte Wirksamkeit im klinischen Alltag. Ein intramuskulärer Impfstoff mit rekombinantem CagA, VacA und HP-NAP (*neutrophil-activating-protein*) war immunogen und sicher in einer Phase-I-Studie [114].

Es gibt mehrere Gründe, warum derzeit die Entwicklung eines *H. pylori*-Impfstoffs zu stagnieren scheint: Ein wichtiger Punkt ist die Unfähigkeit der aktuellen Impfstoffe eine vollständig protektive Immunantwort zu erzielen [115], was sicherlich auf der noch unvollständigen Kenntnis der Immunitätsmechanismen gegen *H. pylori* basiert. Ein weiterer Faktor, der die Impfstoffentwicklung sicherlich einschränkt, ist die evolutionäre Koadaptation von *H. pylori* und seinem Wirt [116].

4.1 Zytokine

Um die Immunreaktionen gegen *H. pylori* nach Immunisierung einordnen zu können, wurden in Überständen von Biopsien aus der Schleimhaut von Antrum und Duodenum die Sekretion der Zytokine TNF α und IFN γ sowie IL-4 und IL-10 bestimmt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit decken sich zum Teil mit den Ergebnissen anderer Gruppen, die sowohl in der akuten als auch in der chronischen Phase der *H. pylori* – Infektion die erhöhte Produktion von verschiedenen Zytokinen nachweisen konnten [56-61, 67, 69, 88-100, 117-119].

Eine signifikant erhöhte lokale IFN γ – Konzentration in den Antrum-Biopsien der *H. pylori* infizierten Patienten im Vergleich zu Kontrollgruppen beschreiben mehrere Autoren [58, 59]. Auch Karttunen et. al. berichtet von einer erhöhten Zahl der IFN γ sezernierenden Zellen bei Gastritis, wobei bei *H. pylori* negativen Gastritiden eine signifikant höhere Anzahl der IFN γ sezernierenden Zellen beobachtet wurde, als bei *H. pylori* positiven Gastritiden [56], was nicht mit den hier vorliegenden Ergebnissen übereinstimmt.

In der vorliegenden Studie zeigte sich im Gesamtkollektiv nach ca. 6 Wochen nach der Belastungsinfektion (und ca. 9 Wochen nach Impfung) im Antrum eine signifikante Erhöhung ($p < 0,001$) der sezernierten IFN γ -Konzentrationen, die bei der 3. Gastroskopie nach ca. 12 Wochen nach der Belastungsinfektion bei allen drei Gruppen (DB2, DB4, Kontrolle) auf nicht mehr messbare Werte absanken und sogar signifikant (Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$ /Friedman Test) unter dem Ausgangsniveau lagen. Im Duodenum konnten bereits initial höhere IFN γ -Konzentrationen (MW mit SD 26,7 pg/mg) festgestellt werden; zum Zeitpunkt der 2. Gastroskopie zeigte sich eine nominelle Erhöhung der IFN γ -Konzentration; bei der 3. Gastroskopie kam es jedoch hier auch zu einer signifikanten Senkung ($p < 0,001$).

In Bezug auf die TNF α sind auch erhöhte Konzentrationen bei *H. pylori* positiven Patienten mit Gastritis im Vergleich zu Kontrollpersonen beschrieben [59, 60, 67], einige Autoren geben sogar um den Faktor 3 erhöhte Werte an [61]. In der vorliegenden Studie wiesen die Konzentrationen von TNF α in Antrum-Biopsien einen signifikanten Anstieg zum Zeitpunkt der 2. Gastroskopie (Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 $p < 0,001$) auf. Zum Zeitpunkt der 3. Gastroskopie fielen diese Werte signifikant ab (Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$ und Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,039$). Im Duodenum kam es nach der Impfung und Belastungsinfektion, zum Zeitpunkt der 2. Gastroskopie, zu keinem statistisch relevanten Anstieg der TNF α – Konzentrationen. Jedoch lagen die Werte zum Zeitpunkt der 3. Gastroskopie unter dem Ausgangsniveau (Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$ und Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$).

Im Unterschied zu in der Literatur beschriebenen niedrigeren IL-4-Konzentration bei einer *H. pylori* – Infektion [56, 59, 114-116] wurden in dieser Studie erhöhte IL-4 Werte beobachtet. Im Antrum zeigte sich im Gesamtkollektiv bei der 2. Gastroskopie ein signifikanter Anstieg der mittleren IL-4-Konzentrationen (Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 $p < 0,005$) und ein signifikanter Abfall zur 3. Gastroskopie (Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$). Im Duodenum zeigte sich bei der 2. Gastroskopie kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den initialen IL-4-Konzentrationen, wobei eine nominelle Erhöhung der mittleren Werte zu konstatieren war. Zum Zeitpunkt der 3. Gastroskopie fand sich eine signifikante Senkung im Vergleich zu den Werten der 2. Gastroskopie (Gast-

roskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,002$) und nominell niedrigere Werte im Vergleich zur 1. Gastroskopie.

Auch IL-10, ein antiinflammatorisches Zytokin, ist bei den mit *H. pylori* – infizierten Patienten signifikant erhöht [89-92]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein qualitativ mit den Ergebnissen der anderen Zytokine vergleichbarer Verlauf auch hinsichtlich des IL-10 festgestellt. Nach dem initialen signifikanten Anstieg der IL-10-Konzentration im Antrum im Gesamtkollektiv fielen die gemessenen Werte bei der 3. Gastroskopie signifikant unter das Ausgangsniveau ab (Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 $p < 0,001$, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,018$). Im Duodenum fand sich kein signifikanter Anstieg der IL-10-Konzentration zum Zeitpunkt der 2. Gastroskopie, jedoch aber ein signifikanter Abfall zum Zeitpunkt der 3. Gastroskopie (Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 2 ns, Gastroskopie 2 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$, Gastroskopie 1 vs. Gastroskopie 3 $p < 0,001$).

Insgesamt ergaben sich für die sezernierten Mengen aller vier Zytokine im Verlauf der Infektion keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Impfgruppen und der Kontrollgruppe. Unabhängig vom Impferum erhöhten sich die durchschnittlichen sezernierten Mengen der sowohl entzündlichen als auch regulatorisch wirkenden Zytokine nach der Verabreichung der Impfstoffe und nach der Belastungsinfektion. Im weiteren Verlauf der Infektion konnte dann in allen Fällen wieder ein Absinken der durchschnittlichen Menge an sezernierten Zytokinen festgestellt werden (Abb. 1-16).

An der Stelle sei angemerkt, dass der hier als Adjuvans angewandte Impfstoffträgerstamm (Salmonellenstamm Ty21a) bekanntermaßen eine Lebendvaccine ist und auch eine lokale Immunantwort mit Zytokinsekretion induzieren kann [108]. Entsprechend kann angenommen werden, dass zur Induktion einer signifikanten lokalen Immunantwort sowohl die Impferen (die Antigene Urease A/B (DB2) und HP0231 (DB4) sowie das Adjuvans - Typhoral® L) als auch die Belastungsinfektion beigetragen haben.

Ungeklärt bleiben die Mechanismen, die während des in der vorliegenden Studie aufgezeigten Infektionsverlaufes zur Reduktion der Zytokinsekretion zum Zeitpunkt der 3. Gastroskopie, am Ende der Beobachtungszeit, geführt haben. Ein solcher Prozess mit im weiteren Infektionsverlauf niedrigeren Zytokinkonzentrationen in Bezug auf die *H. pylori* - Infektion wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben.

4.2 FOXP3 – exprimierende T_{reg}

Ergänzend zu den Zytokinen wurde als weiterer klinisch relevanter Bestandteil der Immunantwort die Anzahl an T-Zellen bestimmt, die FOXP3 exprimieren, das ein Marker für natürliche T_{reg} (CD4⁺FOXP3⁺ T-Zellen) darstellt.

Im Antrum lag initial die mittlere Anzahl der T_{reg} auf einem relativ niedrigen Niveau. Nach der Belastungsreaktion stieg die Anzahl bei dem Gesamtkollektiv zunächst, zum Zeitpunkt der 2. Gastroskopie, geringfügig an, während ein signifikanter Anstieg bei der 3. Gastroskopie ($p < 0,001$) im Vergleich zum Ausgangsniveau und zum Zeitpunkt der 2. Gastroskopie ($p = 0,001$) beobachtet werden konnte. Insgesamt wurde etwa eine Vervierfachung der initialen Mittelwerte beobachtet. Die Unterschiede zwischen den Prüfgruppen waren jedoch zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant (Abb. 17-18).

Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen publizierter klinischer Studien, die besagen, dass bei *H. pylori* positiven Patienten 3 bis 4-mal so viele T_{reg} in der Magen- und Duodenalschleimhaut vorkommen wie bei *H. pylori* negativen Kontrollen [85, 87, 120].

Für die Anzahl der FOXP3⁺ T_{reg} gilt aufgrund der erfolgten Beobachtungen weiterhin die Hypothese, dass T_{reg} durch eine negative Regulation des Immunsystems die Eradikation von *H. pylori* behindern [67, 78]. T_{reg} haben einen antiinflammatorischen Effekt, um eine potentiell schädliche Entzündung zu kontrollieren [74]. Indem sie die Immunreaktion supprimieren, begünstigen sie jedoch das Überleben des Erregers [67, 68].

In der vorliegenden Studie stand einer zunächst eher geringen antiinflammatorischen Reaktion bei der 2. Gastroskopie eine deutliche Reaktion bei der dritten Untersuchung gegenüber. Anders als die hier untersuchten Zytokine spielten also die T_{reg} hinsichtlich des längerfristigen Verlaufes eine wesentliche Rolle.

Ein anderes Bild als im Antrum zeigte die Änderung der Anzahl der FOXP3⁺ T_{reg} im Duodenum. Hier lag initial schon eine hohe Anzahl FOXP3⁺ T_{reg} vor. Dieses hohe Niveau senkte sich überraschenderweise nach der Belastungsinfektion ($p = 0,013$) ab. Zum Zeitpunkt der 3. Gastroskopie hatten sich die Mittelwerte aller Gruppen wieder dem Ausgangsbefund angenähert (Abb. 19-20).

Betrachtet man diese Ergebnisse in Zusammenhang mit den bisher publizierten Daten [78, 81-84], so deutet die Entwicklung der FOXP3⁺ T_{reg} im Duodenum in der vorliegenden Studie auf einen erwünschten Effekt im Sinne einer erfolgreichen Immunisierung hin, da sich als Reaktion auf die akute

Infektion die Zahl der T_{reg} deutlich verminderte, was eine erfolgreiche Eradikation begünstigen sollte.

Bei der vorliegenden Studie korrelierte die hohe Anzahl der FOXP3+ Zellen bei der ersten und dritten Kontrolle nicht mit den Zytokin-Konzentrationen. So ging im Duodenum die hohe Anzahl FOXP3+ T_{reg} bei der 1. und 3. Gastroskopie mit sehr niedrigen Mengen an sezernierten IL-4 und IL-10 einher, also mit einer schwachen Th2- und regulatorischen Antwort. Der relativ geringen Anzahl der FOXP3+ T_{reg} bei der 2. Gastroskopie, direkt nach der Belastungsinfektion, stand hingegen eine hohe Sekretion von IL-4 und IL-10 gegenüber.

Dennoch stehen die Ergebnisse der FOXP3+ Zellen im klaren Kontext zur aktuellen Literatur, wonach die *H. pylori* Infektion zu einer verstärkten Infiltration von CD4+, CD25+, FOXP3+ T_{reg} in die gastrale Mukosa führt [73, 74, 85, 87, 88]. Jedoch ist ihre funktionelle Bedeutung in der Auseinandersetzung zwischen Bakterien und Immunsystem des Wirts bisher unzureichend bekannt.

Überraschend bleibt der Umstand, dass initial, zum Zeitpunkt der 1. Gastroskopie, in der Schleimhaut des Duodenums entgegen der Erwartung relativ hohe Zahlen an T_{reg} vorhanden waren. Beispielsweise berichtet Chen et al. 2014 bei *H. pylori* negativen gesunden Probanden ca. 7-fach niedrigere CD4+, CD25+ T_{reg} – Zahl im Vergleich zu *H. pylori* positiven Patienten [121].

4.3 Histopathologische Befunde

Im Rahmen der gastroscopischen Untersuchungen wurden auch aus Corpus- und Antrumbiopsien lymphoide Infiltration, neutrophile Infiltration, epitheliale Regeneration und mukosaler Abbau (extern, von Prof. Stolte) analysiert. Aus den vier Einzelparametern wurde ein Summenscore gebildet. Die mittleren Scores entwickelten sich von einem niedrigeren Niveau (mittlerer Score: 1,0-1,1) zum Zeitpunkt der 1. Gastroskopie zu einem durchweg signifikant höheren Niveau zum Zeitpunkt der 2. Gastroskopie. Dieses Niveau blieb dann in den meisten Fällen stabil (Abb. 21-24).

Die Ergebnisse zeigen, dass es unabhängig vom Impferum nach der Belastungsinfektion zu deutlichen Entzündungsreaktionen gekommen war, die auch im weiteren Verlauf weitgehend bestehen blieben. Hieraus kann der Schluss gezogen werden, dass die hochakute Entzündungsphase zum Zeitpunkt der zweiten Gastroskopie bereits überwunden war und die Probanden sich bereits in der Phase der chronischen Infektion befanden.

Aufgrund hypothetischer Überlegungen wäre für einen protektiven Impfschutz grundsätzlich eine unveränderte Fortdauer der Th1-Antwort, ggf. vielleicht sogar eine Verstärkung sinnvoll [33, 102]. Nicht erwünscht ist eine Abschwächung der Immunreaktion, solange der Erreger persistiert. Dies wurde im Rahmen dieser Studie auch tatsächlich erreicht: Die histopathologischen Befunde zeigten im Beobachtungsverlauf eine deutliche Entzündungsaktivität. Jedoch führte die histologisch nachweisbare Entzündung nicht zur Eradikation. Es gab nur vier Probanden, die die Infektion abwehren konnten. Einen in der Gruppe DB4 und drei in der Kontrollgruppe. Was klar zeigt, dass die Impfstämme keinen protektiven Einfluss auf die Infektion hatten.

In etwa übereinstimmend mit den histopathologischen Veränderungen war der Verlauf der Anzahl FOXP3⁺ T_{reg}. Jedoch, nicht ohne weiteres passen die Befunde ins Bild des Zytokinmusters. Initial standen einem geringgradig entzündlichen histopathologischen Befund zwar entsprechend niedrige Zytokinsekretionen gegenüber. Durchaus konform war auch die Erhöhung der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IFN γ nach der Belastungsinfektion zum Zeitpunkt der 2. Gastroskopie.

Während TNF α und IFN γ im weiteren Verlauf wieder auf das Ausgangsniveau absanken, blieb der histopathologische Befund jedoch in dessen Ausprägung unverändert. Weder der TNF α noch das IFN γ korrelierte also klar mit dem Grad der entzündlichen Veränderungen, was überraschend ist aber mit den Ergebnissen von Strömberg et al. bereits 2003 übereinstimmt, dass der Grad der Entzündung den Zytokinspiegel nicht beeinflusst [122].

Möglicherweise brauchen die histologischen Veränderungen einfach länger zur Regeneration als die ursächliche inflammatorische Zytokinaktivierung anhält und FOXP3⁺ T_{reg} vermehren sich parallel zur Entzündung, um diese wenigstens teilweise zu kontrollieren.

In Ergänzung zu den vier Pathologie-Parametern (lymphoide Infiltration, neutrophile Infiltration, epitheliale Regeneration und mukosaler Abbau) und deren Summenscore wurden als zwei weitere Parameter noch der Score der lymphoiden Aggregate und der mittlerer Summenscore errechnet aus der jeweiligen Anzahl der positiven Befunde von vier *H. pylori*-Nachweisverfahren herangezogen.

Das Ergebnis der lymphoiden Aggregate entsprach hierbei qualitativ den anderen vier Pathologie-Parametern.

Der *H. pylori*-Nachweis erfolgte mittels Kultur (Anzucht, nur im Antrum), ¹³C-Atemtest, Helicobacter-Urease-Test (nur im Antrum) und histologischem Nachweis mittels Färbung (Warthin-Starry-Silver-Färbung (WS) im Antrum und Corpus). Signifikante Unterschiede zwischen den drei

Prüfgruppen konnten auch hinsichtlich dieses Parameters im Wesentlichen nicht gezeigt werden (Abb. 25).

4.4 Vergleich der *H. pylori* positiven vs. *H. pylori* negativen Probanden

Da das Muster der sezernierten Zytokine, die Veränderung der Anzahl der FOXP3⁺ T_{reg} und der Grad der pathologischen Veränderungen keine wesentlichen Unterschiede zwischen den drei Gruppen ergab und die beiden Impfsereen (DB2 und DB4) nicht in der Lage waren, eine protektive Immunität zu induzieren, entspricht der Verlauf der Belastungsinfektion wahrscheinlich einer natürlich verlaufenden *H. pylori* Infektion. Aufgrund dessen wurden unabhängig von der Prüfgruppe ergänzend Unterschiede zwischen Probanden, die in der Lage waren die *H. pylori*-Infektion zu eliminieren, und Probanden, die die Infektion nicht abwehren konnten, analysiert.

Als *H. pylori* negative Probanden bzw. Eradizierer wurden die vier Probanden betrachtet, bei denen in allen vier Nachweisverfahren zum Zeitpunkt der 3. Gastroskopie ein negativer *H. pylori* Befund vorlag. Aus der Kontrollgruppe waren solche drei Probanden, und einer aus der DB4-Gruppe.

In Hinblick darauf, dass drei von vier Eradizierern aus der Kontrollgruppe, die nur Adjuvans Typhoral® L erhalten haben, waren, handelt es sich hierbei entweder um eine immunologische Kreuzreaktion oder um eine spontane Eradikation.

Zuletzt wurden die Ergebnisse dieser vier Probanden einzeln mit den Mittelwerten der *H. pylori* positiven Probanden verglichen.

Insgesamt konnte bei den *H. pylori* negativen Probanden keine Tendenz zu einer gesteigerten oder verminderten IFN γ Antwort bei einer eher durchschnittlichen Th2-Antwort beobachtet werden. TNF α als eher unspezifisches proinflammatorisches Zytokin scheint bei den *H. pylori* negativen Probanden eher vermindert sezerniert zu werden. Ein ganz eindeutiges Muster konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Abb. 26-33). Die angestellten hypothetischen Überlegungen, dass eine erfolgreiche Eradikation mit einer Supprimierung von Th2-Antwort bzw. Supprimierung von IL-4 oder IL-10 [32, 101] einhergehen könnte, konnten anhand dieser Ergebnisse nicht bestätigt werden.

Zwischen den vier Eradizierern und der *H. pylori* positiven Probandengruppe fanden sich hinsichtlich der Anzahl der FOXP3⁺ Zellen sowohl im Antrum als auch im Duodenum keine statistisch signifikanten Unterschiede (Abb. 34-35). Jedoch lagen die Einzelwerte bei den *H. pylori* negativen Probanden zum Zeitpunkt der 3. Gastroskopie, mit einer Ausnahme von einem Probanden im Duodenum, unterhalb des Mittelwertes der *H. pylori* positiven Probandengruppe. Im Hinblick auf die

Anzahl der FOXP3+ T_{reg} aus den Antrumbiopsien wiesen die *H. pylori* negativen Probanden ebenfalls eine niedrigere Anzahl als die *H. pylori* positiven Probanden auf.

Dies schien darauf hinzudeuten, dass das Potential zur Eradikation des Erregers tatsächlich mit einer Suppression der T_{reg} zusammenhängen könnte, wie dies der Grundhypothese entsprach. Bei einer geringeren immunsuppressiven Antwort ist eher eine geringe Anzahl der FOXP3+ Zellen zu erwarten und dies entspricht einer größeren Chance der Eradikation.

Die *H. pylori* negativen Probanden wiesen bei der 2. und 3. Gastroskopie keinen erkennbar geringeren Pathologiegrad auf, verglichen mit den *H. pylori* positiven Probanden. Bei drei von vier Probanden, die bei der 3. Gastroskopie einen eindeutig negativen *H. pylori* Befund aufgewiesen hatten, war der Grad der histopathologischen Veränderungen (Summenscore) nahezu mit dem Mittelwert der *H. pylori* positiven Probanden identisch; die Abweichungen waren nur minimal (Abb. 38-39). Bei einem *H. pylori* negativen Probanden fand sich jedoch ein etwas abweichender Verlauf: Bei der 2. Gastroskopie zeigte der Proband einen Score von 2 und bei der 3. Gastroskopie einen Score von 3, während bei den anderen drei Probanden bei beiden Kontrollen ein Score zwischen 6 und 7 lag. Der Proband, der einen abweichenden Pathologiebefund zeigte, war aus der DB4-Gruppe; die anderen drei waren der Kontrollgruppe zugehörig. Entsprechend könnte der Verlauf als eine protektive Immunität interpretiert werden. Durch die erfolgreiche Immunabwehr könnte es zu einem milderen Verlauf der Infektion gekommen sein. Es fand sich bei diesem Probanden auch die größte IFN γ -Sekretionsspitze nach der Belastungsinfektion im Antrum, was auf eine stärkere spezifische Abwehrreaktion hindeutet (entsprechend der Literatur [55-60]). Die anderen Zytokine zeigten bei diesem der DB4-Gruppe zugehörigen Probanden keinen auffälligen Verlauf.

Die hier dargestellten Analysen der vier *H. pylori* negativen Probanden – Eradizierer, die die Infektion erfolgreich eliminiert haben, verglichen mit *H. pylori* positiven Probanden – Nicht-Eradizierern ergeben folgende richtungsweisende Ergebnisse:

Das FOXP3-Expressionsmuster scheint geeignet die Grundhypothese zu stützen, dass eine erfolgreiche Eradikation mit einer Suppression der Th2 - Antwort assoziiert sein könnte.

In den Analysen dieser und der vorangegangenen Studie konnten eindeutige Hinweise gesammelt werden, dass die Eradikation von *H. pylori* mit einer protektiven Th1 Antwort (erhöhte IFN-Expression im peripheren Blut) verknüpft ist [110].

4.5 Schlussfolgerung

Angesichts der Zunahme von Antibiotika-Resistenzen wäre die Entwicklung einer zuverlässigen Impfung gegen *H. pylori* ein entscheidender Fortschritt in der Prophylaxe gastrointestinaler Erkrankungen.

In dieser Studie wiesen die *H. pylori* Eradizierer nur ein moderat von den Nicht-Eradizierern abweichendes Zytokin-, FOXP3- oder Pathologie-Muster auf. Mittels der hier durchgeführten Analyse konnte nicht geklärt werden, welche immunologischen Mechanismen zur *H. pylori* - Elimination bei einzelnen Probanden geführt haben. Jedoch konnte die Hypothese, dass eine erfolgreiche Eradikation mit einer Unterstützung der Th1-Antwort zusammenhängen müsse [33, 59, 67, 103], in weiterführenden Experimenten zu dieser und der vorangegangenen *H. pylori* Vaccinierungsstudie bestätigt werden [110].

Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen den aktuellen Wissensstand, dass es sich bei der *H. pylori* induzierten Immunantwort um ein sehr komplexes Geschehen handelt, wobei sich die einzelnen Komponenten gegenseitig beeinflussen können, und dies in beiderlei Hinsicht: sowohl in Richtung Aktivierung als auch in Richtung Suppression [123].

In der hier vorliegenden Studie konnte eine Verminderung von IL-4 und IL-10 in der Folge der Belastungsinfektion nicht beobachtet werden. Unabhängig davon scheinen anhand der Ergebnisse dieser Studie die beiden Zytokine im längerfristigen bzw. chronischen Verlauf keine Rolle zu spielen, da gezeigt werden konnte, dass sich sowohl IL-4 als auch IL-10 mittelfristig wieder auf dem Niveau des nicht infizierten Probanden bewegten.

Bezüglich der hier dargestellten Ergebnisse ist kritisch anzumerken, dass zwei Messzeitpunkte den Verlauf des Zytokinmusters und des FOXP3-Sekretionsmusters während der Infektion nicht ausreichend aufzeigen können. Zudem war die Zahl der Eradizierer in dieser zweiten Studie klein und bestand kein ausgewogenes Verhältnis zur Nicht-Eradizierer-Gruppe. Der Zufallsbefund von ein oder zwei Ausreißern in einer solch kleinen Gruppe von nur vier Probanden macht Vergleiche schwierig. Aussagekräftige Analysen waren mit der deutlich größeren Eradizierer-Gruppe der beiden Studien zusammen besser möglich [110].

Zum besseren Verständnis der Rolle der T_{reg} während der *H. pylori* Infektion muss zunächst ein Agens gefunden werden, welches die Aktivierung und Vermehrung dieser immunsuppressiven Zellen unterdrücken kann. Ob es bei einer solchen Suppression zur Eradikation von *H. pylori* oder nur zu einer Verstärkung der Schleimhautentzündung kommt, wird sich zeigen.

Im Tierversuch konnte durch eine Verstärkung der Th1-Antwort und eine Verminderung der T_{reg} im Rahmen einer Immunisierung zwar eine Reduktion der bakteriellen Last um 90 % gezeigt werden, eine komplette Eradikation wurde jedoch nicht erreicht. Dafür kam es allerdings zur Verstärkung der Gastritis [124]. In diesem Zusammenhang gilt es auch zu bedenken, dass alles was im Tierversuch, insbesondere im Mausmodell demonstriert werden konnte, nicht auf den Menschen zutreffen muss. Die Impfstoffe, die bei Mausmodellen erfolgreich waren, haben bei Menschen keine Protektivität erbracht [104, 105]. Insofern sind die Regulationsmechanismen bei Menschen sicherlich komplexer als bei der Maus, da der Mensch ein natürlicher Wirt von *H. pylori* ist, die Maus hingegen nicht. Angesichts der aktuellen Datenlage [125, 126] ist wahrscheinlich zumindest eine Balance zwischen Th1 oder Th17/T_{reg} und Th2 notwendig, um auf der einen Seite eine wirksame Immunprotektion zu erreichen, und auf der anderen Seite vor dem schädigenden Einfluss der inflammatorischen Elemente zu schützen, wie sie durch die Th1-Immunantwort verursacht werden .

Sofern bei einer wirksamen Immunisierung gegen *H. pylori* tatsächlich die Th1-Antwort die wichtigste Rolle spielen sollte, wovon nach dem derzeitigen Kenntnisstand auszugehen ist [125, 127], so führt der Weg möglicherweise über Kombinationen mehrerer Antigenen [125, 128].

Die Leitstruktur eines aktuell sich in der Erprobung befindenden Impfstoffes gegen *H. pylori* soll sich gegen ein Zelloberflächen-Antigen sowie gegen einen Immunevasionsfaktor von *H. pylori* richten und ein proprietäres Adjuvans, um eine T-Zell Antwort hervorzurufen, enthalten. Im Tiermodell soll der Impfstoff therapeutisch und prophylaktisch wirken [129, 130].

Zur Entwicklung eines gleichermaßen effektiven und sicheren Impfstoffes gegen *H. pylori* müssen Studien vor allem an Menschen erfolgen, da tierexperimentelle Studien die immunologischen Mechanismen der *H. pylori* Infektion bei Menschen unzureichend wiedergeben können.

Nach wie vor sind hier viele immunologische Vorgänge insuffizient bekannt. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie haben in diesem Zusammenhang neue Fragen aufgeworfen. Aufgestellte Grundhypothesen konnten nicht hinreichend bestätigt werden. Erwartete Korrelationen lagen nicht vor. Es ist anhand der Ergebnisse nicht möglich zu beurteilen, auf welche Weise es den *H. pylori* Eradizierern gelang, die Infektion erfolgreich zu bekämpfen.

5 Literaturverzeichnis

1. Bizzozero G. Ueber die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehungen ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut. Dritte Mitteilung. Archiv Mikroskopische Anat. 1893; 43:82-152.
2. Krienitz W. Ueber das Auftreten von Spirochäten verschiedener Form im Mageninhalt bei Carcinoma ventriculi. Dtsch Med Wochenschr. 1906; 28:872.
3. Marshall BJ. The discovery that *Helicobacter pylori*, a spiral bacterium, caused peptic ulcer disease. In: Marshall B. (Edt.). *Helicobacter Pioneers* (Firsthand accounts from the scientists who discovered helicobacters. 1892-1982). Blackwell Science. Asia. 2002: 165-202.
4. Marshall BJ, Armstrong JA, McGeachie DB, Glancy RJ. Attempt to fulfill Koch's postulates for pyloric Campylobacter. Med J Aust. 1985; 142:436-439.
5. Zylka-Menhorn V. Nobelpreis für Medizin: Der Bakterientrunk lieferte der Fachwelt den Beweis. Dtsch Arztebl 2005; 102: A-2665.
6. Peek RM, Jr*, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinoma. Nat Rev Cancer. 2002; 2:28-37.
7. IARC. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 1994; 61: 1-241. Biological agents, IARC monographs, vol. 100B. Lyon: IARC; 2012
8. Franceschi F, Zuccalá G, Roccarina D, gasbarrini A. Clinical effects of *Helicobacter pylori* outside the stomach. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2013; 11:234-242.
9. Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, Blaser MJ, Graham DY, Vacher S, Perez-Perez GI, Yamaoka Y, Mégraud F, Otto K, Reichard U, Katzowitsch E, Wang X, Achtman M, Suerbaum S. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. Science. 2003; 299:1582-1585.
10. RKI (Robert Koch Institut). Zur Tätigkeit des Nationalen Referenzzentrums (NRZ) für *Helicobacter pylori*. Epidemiolog Bull. 2005; 24:203-206.
11. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. N Engl J Med. 2002; 347:1175-1186.

12. Rothenbacher D, Bode G, Berg G, Gommel R, Gonser T, Adler G, Brenner H. Prevalence and determinants of *Helicobacter pylori* infection in preschool children: a population-based study from Germany. *Int J Epidemiol.* 1998; 27:135-141.
13. Grimm W, Fischbach W. *Helicobacter pylori* infection in children and juveniles: an epidemiological study on prevalence, socio-economic factors and symptoms. *Dtsch Med Wochenschr.* 2003; 128:1878-83.
14. Brenner H, Weyermann M, Rothenbacher D. Clustering of *Helicobacter pylori* infection in couples: differences between high-and low-prevalence population groups. *Ann Epidemiol.* 2006; 16:516-520.
15. Nedrud, JG. Animal models for gastric *Helicobacter* immunology and vaccine studies. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999 Jun; 24(2):243-50.
16. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19:449-490.
17. Das JC, Paul N. Epidemiology and pathophysiology of *Helicobacter pylori* infection in children. *Indian J Pediatr.* 2007; 74:287-290.
18. Osato MS, Ayub K, Le HH, Reddy R, Graham DY. Houseflies are an unlikely reservoir or vector for *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.* 1998; 36:2786-88.
19. Poms RE, Tatini SR. Survival of *Helicobacter pylori* in ready-to-eat foods at 4 degrees C. *Int J Food Microbiol.* 2001; 63:281-286.
20. Brown LM, Thomas TL, Ma JL, Chang YS, You WC, Liu WD, Zhang L, Gail MH. *Helicobacter pylori* infection in rural China: exposure to domestic animals during childhood and adulthood. *Scan J Infect Dis.* 2001; 33(9):686-691.
21. Fischbach W., Malfertheiner P, Hoffmann J C, Bolten W, Bornschein J, Götze O, Höhne W, Kist M, Koletzko S, Labenz J, Leyer P, Miehle St, Morgner A, Peitz U, Preiß J C, Prinz C, Rosien U, Schmidt W E, Schwarzer A, Suerbaum S, Timmer A, Treiber G, Vieth M. S3 – Leitlinie „*Helicobacter pylori* und gastroduodenale Ulkuskrankheit“ der deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) in Zusammenarbeit mit der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Gesellschaft für Pädiatrie Gastroenterologie und Ernährung e. V. und der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie – AWMF-Register-Nr. 021/001

22. Ricci C, Holton J, Vaira D. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: invasive and non-invasive tests. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2007; 21: 299-313.
23. Goddard AF, Logan RP. Diagnostic methods for *Helicobacter pylori* detection and eradication. *Br J Clin Pharmacol*. 2003; 56: 273-283.
24. Kist M, Glocker E, Suarbaum S. Pathogenese, Diagnostik und Therapie der *Helicobacter pylori*-Infektion. *Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz* 6. 2005; 48: 669-678.
25. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*. 2007; 56:772-781.
26. Selgrad M, Malfertheiner P. Treatment of *Helicobacter pylori*. *Curr Opin Gastroenterol* 2011; 27(6):565–70.
27. Selgrad M, Meissle J, Bornschein J, Kandulski A, Langner C, Varbanova M, Wex T, Tammer J, Schlütter D, Malfertheiner P. Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* in central Germany and its relationship with the number of eradication therapies. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2013 Nov; 25(11): 1257-60. , Oleastro M. Overview of the phytomedicine approaches against *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 2014 May 21; 20(19): 5594-609.
28. Birgit Hibbeler. *Helicobacter pylori*: Tripeltherapie bleibt Standard. *Dtsch Ärztebl* 6. Nov 2015; Jg 112: Heft 45, B 1556.
29. Geis G, Suerbaum S, Forsthoff B, Leying H & Opferkuch W. Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* 1993 May; 38(5): 371–377.
30. O'Toole PW, Lane MC, Porwollik S. *Helicobacter pylori* motility. *Microbes Infect* 2000 Aug; 2(10): 1207–1214.
31. Odenbreit S. Adherence properties of *Helicobacter pylori*: impact on pathogenesis and adaptation to the host. *Int. J. Med. Microbiol*. 2005 Sep. 295(5):317-324.
32. Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7(11): 629-41.

33. Prinz C, Hafsi N, Volland P. *Helicobacter pylori* virulence factors and the host immune response: implications for therapeutic vaccination. *Trends Microbiol.* 2003; 11: 134-138.
34. Dundee WG, de Bernard M, Montecucco C: Virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol* 2001; 290: 647-658.
35. Shiota S, Suzuli R, Yamaoka Y. The significance of virulence factors in *Helicobacter pylori*. *Journal of Digestive Diseases* 2013 Jul;14(7): 341-349.
36. Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 Jun 20;97(13): 7533-8.
37. Rad R, Gerhard M, Lang R, Schöniger M, Rösch T, Schepp W, Becker I, Wagner H, Prinz C. The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. *J Immunol* 2002 Mar 15;168(6):3033-41.
38. Hermann Brenner, Dietrich Rothenbacher. *Helicobacter-pylori-Infektion und Magenkrebs – eine unterschätzte Beziehung.* *Dtsch Ärztebl* 2005; 102: A 1740-1743[Heft 24]
39. Kuipers EJ, Uytterlinde AM, Peña AS, Roosendaal R, Pals G, Nelis GF, Festen HP, Meuwissen SG. Long-term sequelae of *Helicobacter pylori* gastritis. *Lancet.* 1995a; 345: 1525-1528.
40. Baik SC, Youn HS, Chung MH, Lee WK, Cho MJ, Ko GH, Park CK, Kasai H, Rhee KH. Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Cancer Res.* 1996; 56: 1279-1282.
41. Kuipers EJ. *Helicobacter pylori* and the risk and management of associated diseases: gastritis, ulcer disease, atrophic gastritis and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther.* 1997; 11 Suppl 1: 71-88.
42. Kuipers EJ, Thijs JC, Festen HP. The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 1995; 9 Suppl 2: 59-69.
43. Ernst PB, Gold BD. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol.* 2000; 54: 615-640.
44. Parsonnet J, Isaacson PG. Bacterial infection and MALT lymphoma. *N Engl J Med.* 2004; 350: 213-215.

45. Eidt S, Stolte M, Fischer R. Helicobacter pylori gastritis and primary gastric non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Pathol.* 1994; 47: 436-439.
46. Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, Gelb AB, Warnke RA, Jellum E, Orentreich N, Vogelman JH, Friedman GD. Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med.* 1994; 330: 1267-1271.
47. Zhuang Y, Shi Y, Liu XF, Zhang JY, Liu T, Fan X, Luo J, Wu C, Yo S, Chen L, Luo P, Guo G, Liu Z, Tang B, Mao XH, Guo Y, Zou QM. Helicobacter pylori infected macrophages induce Th17 cell differentiation. *Immunology.* 2011 Jan; 216(1-2): 200-207.
48. Pérez-Pérez GI, Shepherd VL, Morrow JD, Blaser MJ. Activation of human THP-1 cells at rat bone marrow-derived macrophages by Helicobacter pylori lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 1995 Apr; 63(4): 1183-1187.
49. D'Elis MM, Appelmek BJ, Amedei A, Bergman MP, Del Prete G. Gastric autoimmunity: the role of Helicobacter pylori and molecular mimicry. *Trends Mol Med* 2004 Jul;10(7):316–323.
50. Gewirtz AT, Yu Y, Krishna US, Israel DA, Lyons SL, Peek RM Jr. Helicobacter pylori flagellin evades toll-like-receptor 5-mediated innate immunity. *J Infect Dis.* 2004; 189(10):1914-20.
51. Gebert B, Fischer W, Weiss E, Hoffmann R, Haas R. Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science.* 2003; 301: 1099-10102.
52. Wroblewski LE, Peek RM Jr, Wilson KT. Helicobacter pylori and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol rev.* 2010 Oct; 23(4):713-39.
53. Kabir S. The role of interleukin-17 in the helicobacter pylori induced infection and immunity. *Helicobacter.* 2011 Feb;16(1):1-8.
54. Akhiani AA, Schön K, Franzén LE, Pappo J, Lycke N. Helicobacter pylori-specific antibodies impair the development of gastritis, facilitate bacterial colonization, and counteract resistance against infection. *J Immunol.* 2004; 172: 5024-5033.
55. Sayi A, Kohler E, Toller IM, Flavell RA, Müller W, Roers A, Müller A. TLR-2-Activated B Cells Suppress Helicobacter-Induced Preneoplastic Gastric Immunopathology by Inducing T Regulatory-1 Cells. *J Immunol.* 2011; 186(2): 878-890.

56. Karttunen R, Karttunen T, Ekre HP, MacDonald TT. Interferon gamma and interleukin 4 secreting cells in the gastric antrum in *Helicobacter pylori* positive and negative gastritis. *Gut*. 1995; 36: 341-45.
57. Pellicano A, Sebkova L, Monteleone G, Guarneri G, Imeneo M, Pallone F, Lizza F. Interleukin-12 drives the Th1 signaling pathway in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Infect Immun*. 2007 Apr;75(4): 1738-44.
58. Kotłowska-Kmieć A, Korzon M, Łuczak G, Bakowska A, Kozielska E, Galińska A, Borkowska A, Plata-Nazar K, Furtak J, Bogotko-Szarszewska M. Evaluation of selected immunocompetent cells expression in gastric mucosa in children with *Helicobacter pylori* infection before and after eradication treatment—a preliminary study. *Med Wieku Rozwoj*. 2007 Oct-Dec;11(4):393-9.
59. D'Elíos, M. M., M. Manghetti, M. De Carli, F. Costa, C. T. Baldari, D. Burróni, J. L. Telford, and S. Romagnani. 1997. T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J. Immunol*. 158:962-967.
60. D'Elíos MM, Andersen LP. *Helicobacter pylori* Inflammation, Immunity, and Vaccines. In: *The Year in Helicobacter 2007*. Graham DY, European *Helicobacter* Study Group (Hrsg.). *Helicobacter*. 2007; 12: 15-19.
61. Augusto AC, Miguel F, Mendonça S, Pedrazzoli J Jr, Gurgueira SA. Oxidative stress expression status associated to *Helicobacter pylori* virulence in gastric diseases. *Clin Biochem*. 2007 Jun;40(9-10):615-22.
62. Kamradt AE, Greiner M, Ghiara P, Kaufmann SH. *Helicobacter pylori* infection in wild-type and cytokine-deficient C57BL/6 and BALB/c mouse mutants. *Microbes Infect*. 2000; 2: 593-597.
63. Garhart CA, Nedrud JG, Heinzl FP, Sigmund NE, Czinn SJ. Vaccine-induced protection against *Helicobacter pylori* in mice lacking both antibodies and interleukin-4. *Infect Immun*. 2003; 71: 3628-3633.
64. Blanchard TG, Czinn SJ, Redline RW, Sigmund N, Harriman G, Nedrud JG. Antibody-independent protective mucosal immunity to gastric *Helicobacter* infection in mice. *Cell Immunol*. 1999; 191: 74-80.
65. Sutton P, Wilson J, Kosaka T, Wolowczuk I, Lee A. Therapeutic immunization against *Helicobacter pylori* infection in the absence of antibodies. *Immunol Cell Biol*. 2000; 78: 28-30.

66. Ermak TH, Giannasca PJ, Nichols R, Myers GA, Nedrud J, Weltzin R, Lee CK, Kleanthous H, Monath TP. Immunization of mice with urease vaccine affords protection against helicobacter pylori infection in the absence of antibodies and is mediated by MHC class II-restricted responses. *J Exp Med.* 1998; 188: 2277-2288.
67. Chmiela M, Michetti P. Inflammation, immunity, vaccines for Helicobacter infection. *Helicobacter.* 2006; 11: 21-26.
68. O'Keeffe J, Moran AP. Conventional, regulatory, and unconventional T cells in the immunologic response to Helicobacter pylori. *Helicobacter.* 2008;13:1-19.
69. Velin D, Michetti P. Immunology of Helicobacter pylori infection. *Digestion.* 2006; 73: 116-123.
70. Beswick EJ, Pinchuk IV, Earley RB, Schmitt DA, Reyes VE. Role of gastric epithelial cell-derived transforming growth factor beta in reduced CD4+ T cell proliferation and development of regulatory T cells during Helicobacter pylori infection. *Infect Immun.* 2011 Jul; 79(7):2737-2745.
71. Bimczock D, Grams JM, Stahl RD, Waites KB, Smythies LE, Smith PD. Stromal regulation of human gastric dendritic cells restricts the Th1 response to Helicobacter pylori. *Gastroenterology.* 2011 Sep; 141(3):929-938.
72. O'Garra A, Vieira PL, Vieira P, Goldfeld AE. IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest.* 2004; 114: 1372-1378.
73. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003; 4: 330-336.
74. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T Cell development by the transcription factor FOXP3. *Science* 2003; 299: 1057-1061.
75. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat.* 2003; *J Immunol.* 4: 337-342.
76. Uhlig HH, Coombes J, Mottet C, Izcue A, Thompson C, Fanger A, Tannapfel A, fontenot JD, Ramsdell F, Powrie F. Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J Immunol.* 2006 Nov 1; 177(9): 5852-60.

77. Taams LS, Palmer DB, Akbar AN, Robinson DS, Brown Z, Hawrylowicz CM. Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation. *Immunology*. 2006; 118: 1-9.
78. Kandulski A, Wex T, Kuester D, Peitz U, Gebert I, Roessner A, Malfertheiner P. Naturally occurring regulatory T cells (CD4+, CD25^{high}, FOXP3+) in the antrum and cardia are associated with higher *H. pylori* colonization and increased gene expression of TGF-beta1. *Helicobacter*. 2008; 13: 295-303.
79. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3: 253-257.
80. Scalzo K, Plebanski M, Apostolopoulos V. Regulatory T-cells: immunomodulators in health and disease. *Curr Top Med Chem*. 2006; 6: 1759-1768.
81. Vieira PL, Christensen JR, Minaee S, O'Neill EJ, Barrat FJ, Boonstra A, Barthlott T, Stockinger B, Wraith DC, O'Garra A. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2004; 172: 5986-5993.
82. Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol*. 2001; 2: 816-822.
83. Harris PR, Wright SW, Serrano C, Riera F, Duarte I, Torres J, Peña A, Rollán A, Viviani P, Guiraldes E, Schmitz JM, Lorenz RG, Novak L, Smythies LE, Smith PD. *Helicobacter pylori* gastritis in children is associated with a regulatory T-cell response. *Gastroenterology*. 2008; 134: 491-499.
84. Coombes JL, Robinson NJ, Maloy KJ, Uhlig HH, Powrie F. Regulatory T cells and intestinal homeostasis. *Immunol Rev*. 2005; 204: 184-194.
85. Lundgren A, Strömberg E, Sjöling A, Lindholm C, Enarsson K, Edebo A, Johnsson E, Suri-Payer E, Larsson P, Rudin A, Svennerholm AM, Lundin BS. Mucosal FOXP3-expressing CD4+ CD25^{high} regulatory T cells in *Helicobacter pylori*-infected patients. *Infect Immun*. 2005; 73: 523-531.
86. Bimczok D, Clements RH, Waites KB, Novak L, Eckhoff DE, Mannon PJ, Smith PD, Smythies LE. Human primary gastric dendritic cells induce a Th1 response to *H. pylori*. *Mucosal Immunology* 2010 May; 3(3): 260-269.
87. Rad R, Brenner L, Bauer S, Schwendy S, Layland L, da Costa CP, Reindl W, Dossumbekova A, Friedrich M, Saur D, Wagner H, Schmid RM, Prinz C. CD25+/Foxp3+

- T cells regulate gastric inflammation and *Helicobacter pylori* colonization in vivo. *Gastroenterology*. 2006;131:525-537.
88. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol*. 2008;180:5771-5777.
89. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:683-765.
90. Oderda G, Vivanza D, Rapa A, Boldorini R, Bonsignori I, Bona G. Increased interleukin-10 in *Helicobacter pylori* infection could be involved in the mechanism protecting from allergy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007 Sep;45(3):301-5.
91. Karttunen RA, Karttunen TJ, Yousfi MM, et al. Expression of mRNA for interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-12 (p40) in normal gastric mucosa and in mucosa infected with *Helicobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol* 1997;32:22-7.
92. Chen W, Shu D, Chadwick VS. *Helicobacter pylori* infection: mechanism of colonization and functional dyspepsia Reduced colonization of gastric mucosa by *Helicobacter pylori* in mice deficient in interleukin-10. *J Gastroenterol Hepatol*. 2001;16:377-383.
93. Lü L, Zeng HQ, Wang PL, Shen W, Xiang TX, Mei ZC. Oral immunization with recombinant *Mycobacterium smegmatis* expressing the outer membrane protein 26-kilodalton antigen confers prophylactic protection against *Helicobacter pylori* infection. *Clin Vaccine Immunol*. 2011 Nov; 18(11):1957-61.
94. Flach C-F, Svensson N, Blomquist M, Ekman A, Raghavan S, Holmgren J. A truncated form of HpaA is a promising antigen for use in a vaccine against *Helicobacter pylori*. *Vaccine* 2011; 29(6):1235-41.
95. Summerton NA, Welch RW, Bondoc L, Yang HH, Pleune B, Ramachandran N, Harris AM, Bland D, Jackson WJ, Parks S, Clements JD, Nabors GS. Toward the development of a stable, freeze-dried formulation of *Helicobacter pylori* killed whole cell vaccine adjuvanted with a novel mutant of *Escherichia coli* heat-labile toxin. *Vaccine* 2010; 28(5):1404-11.
96. Zhou WY, Shi Y, Wu C, Zhang WJ, Mao XH, Guo G, et al. Therapeutic efficacy of a multi-epitope vaccine against *Helicobacter pylori* infection in BALB/c mice model. *Vaccine* 2009; 27(36): 5013-9.

97. Panthel K, Jechlinger W, Matis A, Rohde M, Szostak M, Lubitz W, Haas R. Generation of *Helicobacter pylori* ghosts by PhiX protein E-mediated inactivation and their evaluation as vaccine candidates. *Infect Immun* 2003; 71(1): 109–16.
98. Keenan J, Oliaro J, Domigan N, Potter H, Aitken G, Allardyce R, et al. Immuneresponse to an 18-kilodalton outer membrane antigen identifies lipoprotein 20 as a *Helicobacter pylori* vaccine candidate. *Infect Immun* 2000; 68(6): 3337–43.
99. Lee A, Chen M. Successful immunization against gastric infection with *Helicobacter* species: use of a cholera toxin B-subunit-whole-cell vaccine. *Infect Immun* 1994; 62(8): 3594–97.
100. Okuda M, Miyashiro E, Nakazawa T. *Helicobacter pylori* infection in childhood. *J Gastroenterol*. 2004; 39: 809-810.
101. Del Giudice G, Michetti P. Inflammation, immunity and vaccines for *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2004;9:23-28.
102. Taylor JM, Ziman ME, Canfield DR, Vajdy M, Solnick JV. Effects of a Th1- versus a Th2-biased immune response in protection against *Helicobacter pylori* challenge in mice. *Microb Pathog*. 2008;44:20-27.
103. Svennerholm AM, Lundgren A. Progress in vaccine development against *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007;50:146-156.
104. Michetti P, Kreiss C, Kotloff KL, Porta N, Blanco JL, Bachmann D, Herranz M, Saldinger PF, Corthésy-Theulaz I, Losonsky G, Nichols R, Simon J, Stolte M, Ackerman S, Monath TP, Blum AL. Oral immunization with urease and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin is safe and immunogenic in *Helicobacter pylori*-infected adults. *Gastroenterology*. 1999;116:804-812.
105. Kotloff KL, Sztein MB, Wasserman SS, Losonsky GA, DiLorenzo SC, Walker RI. Safety and immunogenicity of oral inactivated whole-cell *Helicobacter pylori* vaccine with adjuvant among volunteers with or without subclinical infection. *Infect Immun*. 2001;69:3581-3590.
106. Altman E, Chandana V, Harrison BA, Veloso-Pitab R, Li a J, Kuolea R, Chena W, Vérez-Bencomob V, Fernandez H, Oth L, Wilson M, Toledo C. Design and immunological properties of *Helicobacter pylori* glycoconjugates based on a truncated lipopolysaccharide lacking Lewis antigen and comprising an α -1,6-glucan chain. *Vaccine* 2012; 30: 7332-7341.

107. Hongying F, Xianbo W, Fang Y, Yang B, Beiguo L. Oral immunization with recombinant *Lactobacillus acidophilus* expressing the adhesin Hp0410 of *Helicobacter pylori* induces mucosal and systemic immune responses. *Clin Vaccine Immunol.* 2014 Feb; 21(2):126-32.
108. Bumann D, Metzger WG, Mansauni E, Palme O, Wentland M, Hurwitz R, Haas G, Aebischer T, Von Specht BU, Meyer TF. Safety and immunogenicity of live recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a expressing urease A and B from *Helicobacter pylori* in human volunteers. *Vaccine.* 2001 Dec 12;20(5-6):845-52.
109. Metzger WG, Mansouri E, Kronawitter M, Diescher S, Soerensen M, Huritz r, Bumann D, Aebischer T, Von Specht BU, Meyer TF. Impact of vector-priming on the immunogenicity of a live recombinant *Salmonella enterica* serovar Thypi Ty21a vaccine expressing urease A and B from *Helicobacter pylori* in human volunteers. *Vaccine.* 2004 Jun 2; 22(17-18): 2273-77.
110. Aebischer T, Bumann D, Epple HJ, Metzger W, Schneider T, Cherepnev G, Walduck AK, Kunkel D, Moos V, Loddenkemper C, Jiadze I, Panasyuk M, Stolte M, Graham DY, Zeitz M, Meyer TF. Correlation of T cell response and bacterial clearance in human volunteers challenged with *Helicobacter pylori* revealed by randomised controlled vaccination with Ty21a-based *Salmonella* vaccines. *Gut.* 2008 Aug; 57(8): 1665-72.
111. Graham DY, Opekun AR, Osato MS, El-Zimaty HM, Lee CK, Yamaoka Y, Qureshi WA, Cadoz M, Monath TP. Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. *Gut.* 2004 Sep;53(9):1235-43.
112. T. Schneider, T. Zippel, W. Schmidt, G. Pauli, U. Wahnschaffe, S. Chakravarti, W. Heise, E.-O. Riecken, M. Zeitz, and R. Ullrich. 1998. Increased immunoglobulin G production by short-term cultured duodenal biopsies from HIV-Infected patients. *Gut.* 42: 357-361.
113. Muhsen K, Pasetti MF, Reymann MK, Graham DY, Levine MM. *Helicobacter pylori* infection affects immune responses following vaccination of typhoid-naive U.S. adults

- with attenuated *Salmonella typhi* oral vaccine CVD 908-htrA. *J Infect Dis.* 2014 May 1; 209(9): 1452-8.
114. Malfertheiner P, Schultze V, Rosenkranz B, Kaufmann SH, Ulrichs T, Novicki D, et al. Safety and immunogenicity of an intramuscular *Helicobacter pylori* vaccine in noninfected volunteers: a phase I study. *Gastroenterology* 2008 135:787–9510.
 115. Sutton P, Chionh YT. Why can't we make an effective vaccine against *Helicobacter pylori*? *Expert Rev Vaccines* 2013; 12:433–4110.
 116. Atherton JC, Blaser MJ. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J Clin Invest* 2009 119:2475–8710.
 117. Crabtree J E. Immune and inflammatory responses to *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1996;215:3–10.
 118. D'Elios M M, Manghetti M, Almerigogna F, Amedei A, Costa F, Burrone D, Baldari C T, Romagagni S, Telford J L, Del Prete G. Different cytokine profile and antigen-specificity repertoire in *Helicobacter pylori*-specific T cell clones from the antrum of chronic gastritis patients with or without peptic ulcer. *Eur J Immunol.* 1997; 27:1751–1755.
 119. Genta R M. The immunobiology of *Helicobacter pylori* gastritis. *Semin Gastrointest Dis.* 1997; 8:2–11.
 120. Kindlund B, Sjöling A, Hansson M, Edebo A, Hansson LE, Sjövall H, Svennerholm AM, Lundin BS. FOXP3-expressing CD4+ T-cell Numbers Increase in Areas of Duodenal Gastric Metaplasia and are Associated to CD4+ T-cell Aggregates in the Duodenum of *Helicobacter pylori*-infected Duodenal Ulcer Patients. *Helicobacter.* 2009; 14: 192-201.
 121. Chen T, Jin R, Huang Z, Hong W, Chen Z, Wang J. The variation of expression of CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in patients with *Helicobacter pylori* infection and eradication. *Hepatogastroenterology* 2014 Mar-Apr; 61(130):507-11.
 122. Strömberg E, Edebo A, Svennerholm AM, Lindholm C. Decreased epithelial cytokine responses in the duodenal mucosa of *Helicobacter pylori*-infected duodenal ulcer patients. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Jan;10(1):116-24.
 123. De Falco M, Lucariello A, Laquinto S, Esposito V, Guerra G, De Luca A. Molecular Mechanisms of *Helicobacter pylori* Pathogenesis. *J Cell Physiol.* 2015 Aug;230(8):1702-7.

124. Sommer F, Wilken H, Faller G, Lohoff M . Systemic Th1 immunization of mice against *Helicobacter pylori* infection with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants does not protect from infection but enhances gastritis. *Infect Immun*. 2004 Feb;72(2):1029-35.
125. Zawahir S, Czinn SJ, Nedrud JG, Blanchard TG. Vaccinating against *Helicobacter pylori* in the developing world. *Gut Microbes*. 2013 Nov 1; 4(6): 568–576.
126. Lina TT, Alzahrani S, Gonzalez J, Pinchuc IV, Beswick EJ, Reyes VE. Immune evasion strategies used by *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenter*. 2014 Sep 28;20(36):12753-66.
127. Larussa T, Leone I, Suraci E, Imeneo M, Lizza F. *Helicobacter pylori* and T Helper Cells: Mechanisms of Immune Escape and Tolerance. Hindawi Publishing Corporation. *Journal of Immunology Research*. 2015, Article ID 981328.
128. Czinn SJ, Blanchard T. Vaccinating against *Helicobacter pylori* infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;8:133-40.
129. Towards the first *Helicobacter pylori* vaccine? *Technologist* online Nov. 6 2014
130. Dr. Alexander Werner, ImevaX GmbH IMX101: Ein neuer therapeutischer Impfstoff gegen *Helicobacter pylori*. Dokumentation: D.B.T Deutsche Biotechnologietage 2015; 22-23 April 2015 Köln, Seite 78.

6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: INF γ in den Antrum-Biopsien im Studienverlauf bei Gesamtkollektiv	26
Abbildung 2: Übersichtsgrafik: INF γ in den Antrum-Biopsien im Studienverlauf bei den einzelnen Prüfgruppen	27
Abbildung 3: INF γ in den Duodenum-Biopsien im Studienverlauf bei Gesamtkollektiv	28
Abbildung 4: Übersichtsgrafik: INF γ in den Duodenum-Biopsien im Studienverlauf bei den einzelnen Prüfgruppen	28
Abbildung 5: TNF α in den Antrum-Biopsien im Studienverlauf bei Gesamtkollektiv	30
Abbildung 6: Übersichtsgrafik: TNF α in den Antrum-Biopsien im Studienverlauf bei den einzelnen Prüfgruppen	30
Abbildung 7: TNF α in den Duodenum-Biopsien im Studienverlauf bei Gesamtkollektiv	31
Abbildung 8: Übersichtsgrafik: TNF α in den Antrum-Biopsien im Studienverlauf bei den einzelnen Prüfgruppen	31
Abbildung 9: IL-4 in den Antrum-Biopsien im Studienverlauf bei Gesamtkollektiv	33
Abbildung 10: Übersichtsgrafik: IL-4 in den Antrum-Biopsien im Studienverlauf bei den einzelnen Prüfgruppen	33
Abbildung 11: IL-4 in den Duodenum-Biopsien im Studienverlauf bei Gesamtkollektiv	34
Abbildung 12: Übersichtsgrafik: IL-4 in den Duodenum-Biopsien im Studienverlauf bei den einzelnen Prüfgruppen	35
Abbildung 13: IL-10 in den Antrum-Biopsien im Studienverlauf bei Gesamtkollektiv	36
Abbildung 14: Übersichtsgrafik: IL-10 in den Antrum-Biopsien im Studienverlauf bei den einzelnen Prüfgruppen	36
Abbildung 15: IL-10 in den Duodenum Biopsien im Studienverlauf bei Gesamtkollektiv	37
Abbildung 16: Übersichtsgrafik: IL-10 in den Duodenum-Biopsien im Studienverlauf bei den einzelnen Prüfgruppen	38
Abbildung 17: Die Anzahl der FOXP3 ⁺ Zellen (n pro 10 hpf) in den Antrum-Biopsien im Studienverlauf bei Gesamtkollektiv	39
Abbildung 18: Übersichtsgrafik: Die Anzahl der FOXP3 ⁺ Zellen (n pro 10 hpf) in den Antrum-Biopsien im Studienverlauf bei den einzelnen Prüfgruppen	39
Abbildung 19: Die Anzahl der FOXP3 ⁺ Zellen (n pro 10 hpf) in den Duodenum-Biopsien im Studienverlauf bei Gesamtkollektiv	40

Abbildung 20: Übersichtsgrafik: Die Anzahl der FOXP3+ Zellen (n pro 10 hpf) in den Duodenum-Biopsien im Studienverlauf bei den einzelnen Prüfgruppen	41
Abbildung 21: Mittlerer Summenscore der vier histopathologischen Parameter in den Antrum-Biopsien im Studienverlauf bei Gesamtkollektiv	42
Abbildung 22: Übersichtsgrafik: Mittlerer Summenscore der vier histopathologischen Parameter in den Antrum-Biopsien im Studienverlauf bei den einzelnen Prüfgruppen	43
Abbildung 23: Mittlerer Summenscore der vier histopathologischen Parameter in den Corpus-Biopsien im Studienverlauf bei Gesamtkollektiv	44
Abbildung 24: Übersichtsgrafik: Mittlerer Summenscore der vier histopathologischen Parameter in den Corpus-Biopsien im Studienverlauf bei den einzelnen Prüfgruppen	44
Abbildung 25: Mittlerer Summenscore der positiven Ergebnisse aus WS, HUT, Atemtest und Kultur zum Zeitpunkt der 2. Gastroskopie und 3. Gastroskopie	48
Abbildung 26: Vergleich der INF γ -Konzentration zwischen den <i>H. pylori</i> negativen und positiven Probanden in den Antrum – Biopsien im Studienverlauf	49
Abbildung 27: Vergleich der INF γ -Konzentration zwischen den <i>H. pylori</i> negativen und positiven Probanden in den Duodenum - Biopsien im Studienverlauf	50
Abbildung 28: Vergleich der TNF α -Konzentration zwischen den <i>H. pylori</i> negativen und positiven Probanden in den Antrum – Biopsien im Studienverlauf	50
Abbildung 29: Vergleich der TNF α -Konzentration zwischen den <i>H. pylori</i> negativen und positiven Probanden in den Duodenum – Biopsien im Studienverlauf	51
Abbildung 30: Vergleich der IL-4-Konzentration zwischen den <i>H. pylori</i> negativen und positiven Probanden in den Antrum – Biopsien im Studienverlauf	51
Abbildung 31: Vergleich der IL-4-Konzentration zwischen den <i>H. pylori</i> negativen und positiven Probanden in den Duodenum – Biopsien im Studienverlauf	52
Abbildung 32: Vergleich der IL-10-Konzentration zwischen den <i>H. pylori</i> negativen und positiven Probanden in den Antrum – Biopsien im Studienverlauf	52
Abbildung 33: Vergleich der IL-10-Konzentration zwischen den <i>H. pylori</i> negativen und positiven Probanden in den Duodenum – Biopsien im Studienverlauf	53
Abbildung 34: Vergleich der Anzahl (n/10HPF) der FOXP3+ Zellen in den Antrum-Biopsien zwischen den <i>H. pylori</i> negativen und positiven Probanden im Studienverlauf	54
Abbildung 35: Vergleich der Anzahl (n/10HPF) der FOXP3+ Zellen zwischen den <i>H. pylori</i> negativen und positiven Probanden in den Duodenum – Biopsien im Studienverlauf	54
Abbildung 36: FOXP3+ Zellen in FOXP3 – Färbung, Antrum-Biopsien	55

Abbildung 37: FOXP3+ Zellen in FOXP3 – Färbung, Duodenum-Biopsien	56
Abbildung 38: Vergleich der Histipathologie-Summscores zwischen den <i>H. pylori</i> negativen und positiven Probanden in den Antrum – Biopsien im Studienverlauf	57
Abbildung 39: Vergleich der Histipathologie-Summscores zwischen den <i>H. pylori</i> negativen und positiven Probanden in den Corpus – Biopsien im Studienverlauf	58
Abbildung 40: Vergleich der $\text{INF}\gamma$ – Konzentration in den Antrum-Biopsien zwischen den <i>H. pylori</i> positiven Probanden und einzelnen <i>H. pylori</i> negativen Probanden	59
Abbildung 41: Vergleich der $\text{INF}\gamma$ – Konzentration in den Duodenum-Biopsien zwischen den <i>H. pylori</i> positiven Probanden und einzelnen <i>H. pylori</i> negativen Probanden	60
Abbildung 42: Vergleich der $\text{TNF}\alpha$ – Konzentration in den Antrum-Biopsien zwischen den <i>H. pylori</i> positiven Probanden und einzelnen <i>H. pylori</i> negativen Probanden	60
Abbildung 43: Vergleich der $\text{TNF}\alpha$ – Konzentration in den Duodenum-Biopsien zwischen den <i>H. pylori</i> positiven Probanden und einzelnen <i>H. pylori</i> negativen Probanden	61
Abbildung 44: Vergleich der IL-4 – Konzentration in den Antrum-Biopsien zwischen den <i>H. pylori</i> positiven Probanden und einzelnen <i>H. pylori</i> negativen Probanden	61
Abbildung 45: Vergleich der IL-4 – Konzentration in den Duodenum-Biopsien zwischen den <i>H. pylori</i> positiven Probanden und einzelnen <i>H. pylori</i> negativen Probanden	62
Abbildung 46: Vergleich der IL-10 – Konzentration in den Antrum-Biopsien zwischen den <i>H. pylori</i> positiven Probanden und einzelnen <i>H. pylori</i> negativen Probanden	62
Abbildung 47: Vergleich der IL-10 – Konzentration in den Duodenum-Biopsien zwischen den <i>H. pylori</i> positiven Probanden und einzelnen <i>H. pylori</i> negativen Probanden	63
Abbildung 48: Vergleich der Anzahl (n/10HPF) der FOXP3+ Zellen in den Antrum-Biopsien zw. den <i>H. pylori</i> positiven Probanden und einzelnen <i>H. pylori</i> negativen Probanden	64
Abbildung 49: Vergleich der Anzahl (n/10HPF) der FOXP3+ Zellen in den Duodenum-Biopsien zw. den <i>H. pylori</i> positiven Probanden und einzelnen <i>H. pylori</i> negativen Probanden	64
Abbildung 50: Vergleich der Histopathologie-Summscores in den Antrum-Biopsien zw. den <i>H. pylori</i> positiven Probanden und einzelnen <i>H. pylori</i> negativen Probanden	65
Abbildung 51: Vergleich der Histopathologie-Summscores in den Corpus-Biopsien zw. den <i>H. pylori</i> positiven Probanden und einzelnen <i>H. pylori</i> negativen Probanden	65
 Tabelle 1: Summe der positiven Befunde bei der 2. Gastroskopie (Basis: pos. histologischer Befund in Antrum oder Corpus mittels WS, HUT, Atemtest, Kultur)	 47

Tabelle 2: Summe der positiven Befunde bei der 3. Gastroskopie (Basis: pos. histologischer Befund in Antrum oder Corpus mittels WS, HUT, Atemtest, Kultur) 47

Tabelle 3: Darstellung der einzelnen Probanden mit eindeutig negativem *H. pylori* Befund bei der dritten Gastroskopie. (Basis: negativer Befund im Antrum und Corpus mittels WS, HUT, Atemtest, Kultur) 58

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	<i>engl. Antigen-presenting cell</i> , Antigen-präsentierende Zelle
BabA	<i>engl. Blood Group Antigen-binding Adhesine</i>
cagA	<i>engl. Cytotoxin Associated Gene A</i>
cagPAI	<i>engl. cag Pathogenicity island</i> , cag Pathogenitätsinsel
CBA	<i>engl. Cytometric bead array</i>
CD	<i>engl. Cluster of Differentiation</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAB	Diaminobenzin
DC	<i>engl. Dendritic Cells</i> , Dendritische Zelle
DNA	<i>engl. Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonekleinsäure
dupA	<i>engl. Duodenal ulcer promoting gene</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>engl. Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay</i>
FCS	<i>engl. fetal bovine serum</i> , fetales Kälberserum
FOXP3	<i>engl. Forkhead-Box-Protein P3</i>
Gastro	Gastroskopie
GM-CSF	<i>eng. Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HPF	<i>engl. High Power Field</i>
HP-NAP	<i>Helicobacter pylori</i> Neutrophilen aktivierendes Protein
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HUT	<i>Helicobacter</i> Urease (Schnell-)Test
IceA	<i>engl. induced by contact with epithelium</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
K	Kontrollgruppe

KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LPS	Lipopolysaccharide
LPL	Lamina Propria Lymphozyten
MALT	<i>engl. mucosa associated lymphatic tissue</i>
MPI	Max-Planck-Institut
MW	Mittelwert
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenorthosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natronlauge
NAP	<i>engl. neutrophil activating protein</i>
NK-Zelle	Natürliche Killer Zellen
ns	nicht signifikant
o.g.	oben genannt
OipA	<i>engl. Outer inflammatory Protein</i>
OMP	<i>engl. Outer membran Protein</i>
P	Signifikanzwert
PAMP	<i>engl. Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
PBA	<i>engl. Phosphate Buffered Saline with NaN₃</i>
PBS	<i>engl. Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>engl. Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Phycoerythrin
pH	pH-Wert
PFA	Paraformaldehyd
PPI	Protonen Pumpen Inhibitor
PRMI	<i>engl. Roswell park Memorial Instituten cell culture, Zellkultur Flüssigmedium mit stabilem Glutamin</i>
PRR	<i>engl. Pattern Recognition Receptor</i>
P/S 10.000U/ml	Penicillin /Streptomycin 10.000U/ml Lösung
ROR γ	<i>engl. Retinoid-like Orphan Receptor</i>
RT	Raumtemperatur
SD	<i>engl. Standart Deviation, Standartabweichung</i>

Tab.	Tabelle
TBS	<i>engl. TRIS Buffered Saline</i> , TRIS-gepufferte NaCl-Lösung
TCR	<i>engl. T cell Receptor</i>
TGF	<i>engl. Transforming Growth Factor</i>
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TLR	<i>engl. Toll-Like Rezeptor</i>
Tr1	regulatorische T-Zelle Typ 1
TRIS	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
URT	<i>engl. Urease rapid test</i> , Urease Schnelltest
<i>vacA</i>	<i>engl. Vacuolating Cytotoxin Gen</i>
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
vs	versus
WHO	<i>engl. World Health Organisation</i>
WS	Warthin-Starry-Silver-Färbung

8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Irma Korten, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Lokale Immunantwort bei einer *Helicobacter pylori* Infektion im Rahmen einer Impfstudie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an der Publikation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

9 Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Irma Korten (geb. Jiadze) hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation 1: Aebischer T, Bumann D, Epple HJ, Metzger W, Schneider T, Cherepnev G, Walduck AK, Kunkel D, Moos V, Loddenkemper C, Jiadze I, Panasyuk M, Stolte M, Graham DY, Zeitz M, Meyer TF. Correlation of T cell response and bacterial clearance in human volunteers challenged with *Helicobacter pylori* revealed by randomised controlled vaccination with Ty21a-based *Salmonella* vaccines. Gut. 2008 Aug; 57(8): 1665-72.

Beitrag im Einzelnen:

Frau Korten hat für die o.g. Publikation in Überständen aus Biopsien von Antrum, Corpus und Duodenum der Probanden eine Reihe an entzündlichen und regulatorischen Zytokinen bestimmt. Zusätzlich hat sie alle im Rahmen der Studie entnommenen Biopsien mittels spezifischer Immunhistochemie auf die Präsenz von FOXP3 positiven Zellen hin untersucht und die Anzahl der FOXP3 positiven Zellen quantifiziert.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

10 Publikationsliste

1: Aebischer T, Bumann D, Epple HJ, Metzger W, Schneider T, Cherepnev G, Walduck AK, Kunkel D, Moos V, Loddenkemper C, Jiadze I, Panasyuk M, Stolte M, Graham DY, Zeitz M, Meyer TF. Correlation of T cell response and bacterial clearance in human volunteers challenged with *Helicobacter pylori* revealed by randomised controlled vaccination with Ty21a-based *Salmonella* vaccines. *Gut*. 2008 Aug; 57(8): 1665-72.

11 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

12 Danksagung

Die Danksagung wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.