

**Zytokin- und Chemokinrezeptor mRNA-Expressionsmuster in der
Magenschleimhaut von Kindern mit und ohne *Helicobacter pylori*-
Infektion**

Bijan Raziorrouh

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Professor Dr. med. Dietrich Reinhardt

**Zytokin- und Chemokinrezeptor mRNA-Expressionsmuster in der
Magenschleimhaut von Kindern mit und ohne *Helicobacter pylori*-Infektion**



Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Bijan Raziorrouh
aus
München
2007

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Koletzko

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. R. Hatz
Prof. Dr. med. D. Jüngst

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. S. Krauss-
Etschmann

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2007

Meiner Familie und Freundin

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... 3

1. EINLEITUNG5

- 1.1. DIE GRUNDLAGEN ZUR HELICOBACTER PYLORI-INFEKTION..... 5
 - 1.1.1. *Epidemiologie*..... 5
 - 1.1.2. *Pathogenese*..... 6
- 1.2. DAS TH1/TH2-MODELL ANHAND DER PATHOGENESE DER HELICOBACTER PYLORI - INFEKTION..... 9

2. ZIELSETZUNG 13

3. MATERIAL UND METHODEN14

- 3.1. PATIENTEN UND GRUPPENEINTEILUNG..... 14
- 3.2. ENDOSKOPIE UND MATERIALGEWINNUNG..... 15
- 3.3. DIAGNOSTISCHE NACHWEISVERFAHREN VON HELICOBACTER PYLORI..... 16
 - 3.3.1. *¹³C-Harnstoff-Atemtest* 16
 - 3.3.2. *Histologie* 16
 - 3.3.3. *Urease-Schnelltest*..... 17
 - 3.3.4. *Kultur*..... 17
- 3.4. RNA-ISOLATION AUS MAGENGeweBE..... 18
- 3.5. REVERSE-TRANSKRIPTION..... 20
- 3.6. REAL-TIME-PCR..... 21
 - 3.6.1. *Grundlagen der PCR*..... 21
 - 3.6.2. *Real-Time RT-PCR und Sequenzierung* 23
- 3.7. AGAROSE-GELELEKTROPHORESE 26
- 3.8. AUSWERTUNGSVERFAHREN..... 28
- 3.9. GERÄTE 29
- 3.10. PLASTIK- UND GLASMATERIAL 30
- 3.11. CHEMIKALIEN, ENZYME, PUFFER UND LÖSUNGEN 31
- 3.12. OLIGONUKLEOTID-SEQUENZEN..... 32

4. ERGEBNISSE..... 34

- 4.1. GRUPPENÜBERSICHT..... 34
 - 4.1.1. *Patientengruppe 1* 34
 - 4.1.2. *Patientengruppe 2* 37
 - 4.1.3. *Patientengruppe 3* 39
- 4.2. INTER-ASSAY VARIABILITÄT..... 40
- 4.3. MRNA-EXPRESSIONS-ANALYSE 41
 - 4.3.1. *Th1-Moleküle*..... 41
 - 4.3.1.1. *CXCR3*..... 41
 - 4.3.1.2. *IFN-gamma*..... 43
 - 4.3.1.3. *IL-12* 44
 - 4.3.2. *Th2-Moleküle*..... 46
 - 4.3.2.1. *CCR4* 46

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.3.2.2. | <i>CRTH2</i> | 47 |
| 4.3.3. | <i>IL-10</i> | 49 |
| 4.3.4. | <i>TLR2 und TLR4</i> | 50 |
| 4.4. | KORRELATION DER MOLEKULARBIOLOGISCHEN MARKER UNTEREINANDER | 53 |
| 4.5. | KORRELATION ZWISCHEN EXPRESSION UND DER SYDNEY-KLASSIFIKATION SOWIE ZWISCHEN EXPRESSION UND ALTER DER PATIENTEN | 54 |
| 5. | DISKUSSION | 55 |
| 5.1. | PROBANDEN | 55 |
| 5.1.1. | <i>Charakteristika der Helicobacter pylori-infizierten Patienten</i> | 55 |
| 5.1.2. | <i>Patientengruppe 2 und 3</i> | 57 |
| 5.1.3. | <i>Bedeutung der Gruppengröße</i> | 59 |
| 5.2. | MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN | 59 |
| 5.2.1. | <i>RNA-Extraktion</i> | 59 |
| 5.2.2. | <i>Reverse-Transkription</i> | 60 |
| 5.2.3. | <i>Real-Time RT-PCR und Quantifikation</i> | 61 |
| 5.2.4. | <i>Gelelektrophorese</i> | 64 |
| 5.3. | ERGEBNISSE | 65 |
| 5.3.1. | <i>Th1-Moleküle</i> | 65 |
| 5.3.1.1. | <i>CCR5 und CXCR3</i> | 65 |
| 5.3.1.2. | <i>IFN-gamma</i> | 66 |
| 5.3.1.3. | <i>IL-12</i> | 67 |
| 5.3.2. | <i>Th2-Moleküle</i> | 68 |
| 5.3.2.1. | <i>CCR4</i> | 68 |
| 5.3.2.2. | <i>CRTH2</i> | 69 |
| 5.3.3. | <i>Weitere Zytokine und Rezeptoren</i> | 71 |
| 5.3.3.1. | <i>IL-10</i> | 71 |
| 5.3.3.2. | <i>TLR2 und TLR4</i> | 72 |
| 5.3.4. | <i>Expression und Sydney-Klassifikation sowie Expression und Alter</i> | 74 |
| 6. | ZUSAMMENFASSUNG | 75 |
| 6.1. | HINTERGRUND UND FRAGESTELLUNG | 75 |
| 6.2. | METHODE | 75 |
| 6.3. | ERGEBNISSE | 76 |
| 6.4. | SCHLUSSFOLGERUNGEN | 77 |
| 7. | ANHANG | 78 |
| 7.1. | LITERATURVERZEICHNIS | 78 |
| 7.2. | ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 97 |
| 7.3. | TABELLENVERZEICHNIS..... | 98 |
| 7.4. | DANKSAGUNG | 99 |
| 7.5. | LEBENS LAUF | 100 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|--|
| °C | Grad Celsius |
| babA2 | Blood group antigen-binding adhesin A2 |
| cagA | Cytotoxin-associated gene A |
| CCR | Chemokinrezeptor |
| cDNA | Komplementäre DNA |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| CRTH2 | Chemoattractant receptor-homologous molecule |
| C _t | Threshold Cycle |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | Enzyme linked immunosorbent assay |
| ENA78 | Epithelial cell-derived neutrophil-activating protein 78 |
| FACS | Fluorescence-activated cell sorter |
| FISH | Fluoreszenz in situ Hybridisierung |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase |
| iceA | Induced by contact with epithelium A |
| IFN- γ | Interferon-gamma |
| Ig- | Immunglobulin |
| IL- | Interleukin |
| IP-10 | Interferon-inducible protein 10 |
| I-TAC | Interferon-inducible T-cell α -chemoattractant |
| kDa | Kilodalton |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| MDC | Macrophage-derived chemokine |
| MHC | Major histocompatibility complex |
| MIG | Monokine-induced by gamma-Interferon |
| min | Minute(n) |
| MIP-1 β | Macrophage Inflammatory Protein-1 β |
| MIP-1 α | Macrophage Inflammatory Protein-1 α |
| mRNA | Messenger Ribonukleinsäure |
| NF- κ B | Nuclear factor kappa B |
| NH ₂ | Ammoniak |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen |
| ÖGD | Ösophago-Gastro-Duodenoskopie |
| oipA | Outer inflammatory protein A |
| PAMPs | Pathogen-associated molecular patterns |

| | |
|---------------|--|
| PBS | Phosphatgepufferte Saline |
| RANTES | Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted |
| SMAD7 | Mothers against decapentaplegic homolog 7 |
| TAE | Tris-Acetat EDTA |
| TARC | Thymus- and activation-regulated chemokine |
| Th | T-Helferzelle |
| TLR | Toll-like receptor |
| TNF- α | Tumor Nekrose Faktor-alpha |
| vacA | Vacuolating cytotoxin A |

1. Einleitung

1.1. Die Grundlagen zur *Helicobacter pylori*-Infektion

Als 1983 den australischen Wissenschaftlern und Nobelpreisträgern Barry Marshall und Robin Warren die kulturelle Anzüchtung von *Helicobacter pylori* gelang, schafften sie einen Meilenstein in der Erforschung von Magenerkrankungen [119;120]. Bereits 1906 beobachtete der deutsche Wissenschaftler Krienitz spiralförmige Bakterien in histologischen Präparaten von an Magenkrebs Verstorbenen. Ihre tatsächlichen Auswirkungen auf den menschlichen Körper waren damals noch nicht bekannt. Heute weiß man, dass *Helicobacter pylori* Auslöser einer chronischen Typ B-Gastritis sein kann und sich sowohl bei Kindern, wie auch bei Erwachsenen begünstigend auf die Entstehung von Duodenal- oder Magenzulzera auswirkt [36;57;68;104;113;142;144]. Eine chronische Infektion kann zu einem Adenokarzinom des Magens oder selten zu einem MALT-Lymphom führen [17;79;113;134;151]. Darüber hinaus soll die *Helicobacter pylori*-Infektion Auslöser extraintestinaler Erkrankungen wie beispielsweise einer chronischen Urtikaria sein, deren Symptome sich nach Eradikation des Keimes verbessern würden [22;48].

1.1.1. Epidemiologie

Helicobacter pylori ist Auslöser der weltweit verbreitetsten chronisch-bakteriellen Infektion des Menschen [28;153]. Aufgrund von Schätzungen vermutet die World Health Organization (WHO), dass etwa die Hälfte der Weltbevölkerung mit *Helicobacter pylori* infiziert ist. Zumeist wird die Infektion in der Kindheit erworben und tritt typischerweise innerhalb von Familien auf [50;70;106;107;149;163]. Meist bleibt die Erkrankung unerkannt und verläuft insbesondere bei Kindern häufig asymptomatisch [73]. Klinisch werden die Patienten durch rezidivierende Bauchschmerzen symptomatisch [45]. Lediglich 10 Prozent der Infizierten entwickeln Magen- oder Duodenalulzera, weniger als ein Prozent erkrankt am Magenkarzinom [33;87]. Hinsichtlich Durchseuchungsrate, Inzidenz und Prävalenz zeigen sich erhebliche regionale Unterschiede [153].

Dabei konnte in Entwicklungsländern im Vergleich zu Industrienationen eine deutlich höhere Inzidenz an Infektionen mit *Helicobacter pylori* und ein früherer Zeitpunkt einer Ansteckung nachgewiesen werden [207]. In epidemiologischen Studien zu *Helicobacter pylori* fällt eine eindeutige Abhängigkeit der Infektionshäufigkeit vom Alter auf [182;204]. Bei Kindern liegt das Infektionsalter in den Industrienationen, wie auch in den Entwicklungsländern, meist deutlich vor dem 10. Lebensjahr [198]. So ergab eine Studie, dass die Prävalenz asymptomatischer in Lybien lebender Kinder zwischen dem 1. und 9. Lebensjahr bei 50 Prozent liegt [10]. Neueste Arbeiten hinsichtlich in Deutschland lebender Risikogruppen, weisen auf einen Rückgang der Prävalenz bei türkisch-stämmigen Kinder hin [164]. Neben regionalen und altersbezogenen zeigen sich bei der *Helicobacter pylori*-Infektion auch sozio-ökonomische Unterschiede [19]. So sind in den USA Afroamerikaner und Lateinamerikaner häufiger betroffen als die weiße Bevölkerung [73;183]. Lebensbedingungen, wie die Wasserqualität, die Sauberkeit der sanitären Einrichtungen, die Haustierhaltung, das Essverhalten, die Wohnverhältnisse sowie der Beruf scheinen ebenfalls einen Einfluß auf die Übertragung von *Helicobacter pylori* zu haben [61;69;86;178;204]. Folgende Übertragungswege von Mensch zu Mensch sind am wahrscheinlichsten: die fäkal-orale und die oro-orale Transmission [124;165]. Möglicherweise spielen auch genetische Faktoren bei der Infektion mit *Helicobacter pylori* eine Rolle. [117;160].

1.1.2. Pathogenese

Helicobacter pylori ist ein gram-negatives Stäbchenbakterium mit U- und S-Formen. Das etwa 3,5 micron lange und 0,5 micron breite Bakterium ist ein schwierig zu kultivierender Keim, der zum Wachstum auf Spezialnährböden bei 37°C drei bis sieben Tage benötigt [71]. *Helicobacter pylori* besitzt Geißeln, die dem Keim eine hohe Motilität verleihen (*Abb. 1*). Dadurch kann es sich in viskösen Lösungen, wie etwa der Schleimschicht des Magens fortbewegen [71]. Um im sauren Milieu des Magens überleben zu können, besitzt *Helicobacter pylori* das Enzym Urease, mit der es Harnstoff zu Ammoniak und Kohlendioxid hydrolysiert und somit den sauren Magensaft neutralisiert [129]. Dabei ermöglichen spezielle pH-abhängige Harnstoffkanäle dem Keim, niedrige pH-Werte im Magen auszugleichen [205;206].

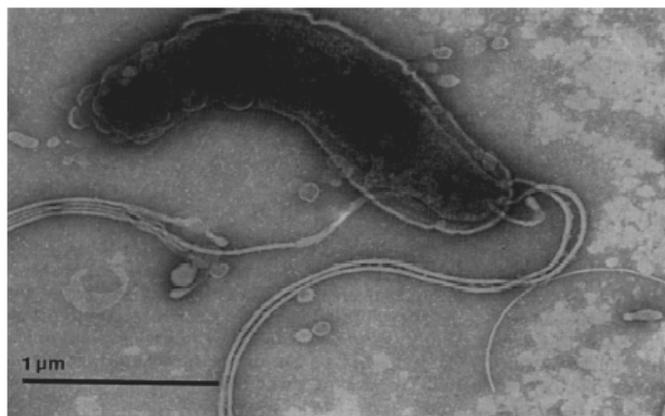


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Helicobacter pylori*. [Malfertheiner P, et al. *Helicobacter pylori*; Thieme Verlag Stuttgart; 1. Auflage]

Neben Urease produziert *Helicobacter pylori* weitere Enzyme, die als Virulenzfaktoren eine Besiedelung der Magenschleimhaut erleichtern sollen [184]. So helfen neben den bereits erwähnten Geißeln, auch Proteasen und Lipasen die Schleimschicht des Magens zu überwinden [183]. Der Kontakt zwischen Keim und Epithelzellen des Magens wird über spezielle Rezeptoren vermittelt [111]. Dieser Prozess der Anheftung kann durch bestimmte Wirtsfaktoren moduliert werden. So exprimieren beispielsweise bestimmte Individuen eine größere Anzahl an Oberflächenrezeptoren, wodurch diese Personen für eine *Helicobacter pylori* - Besiedelung empfänglicher werden [203].

Ein weiterer Pathogenitätsfaktor von *Helicobacter pylori* ist das Zytotoxin VacA mit einem Molekulargewicht von 87 kDa. VacA schädigt *in vivo* die Epithelzellen des Magens [18;59]. Zheng et al. [215] konnte in einer *in vitro*-Studie zeigen, dass VacA durch selektive Blockierung antigen-präsentierender T-Zellen eine immunsuppressive Wirkung besitzt, was wiederum die Persistenz von *Helicobacter pylori* begünstigen soll [23]. Darüber hinaus besitzen *Helicobacter pylori*-Stämme mit unterschiedlichen VacA-Allelen auch eine unterschiedliche Toxizität [103]. Alle *Helicobacter pylori*-Stämme enthalten das Gen, welches für VacA codiert. Allerdings können nur diejenigen Stämme VacA exprimieren, welche zusätzlich das 128 bis 140 kDa schwere Protein CagA codieren [17]. Etwa 85 bis 100 Prozent der Patienten mit einem Duodenalulkus sind mit einem CagA-positiven *Helicobacter pylori*-Stamm infiziert [204]. Neben CagA und VacA konnten viele weitere Virulenzfaktoren beschrieben werden. So sind beispielsweise CagE, IceA, BabA2 und OipA mit Magen- und Duodenalulzera, oder dem Adenokarzinom des Magens assoziiert [65;141;152;201;210].

Obwohl *Helicobacter pylori* nicht-invasiv ist, kommt es im Verlauf der Infektion zu einer ausgeprägten Inflammation und Immunantwort [38]. Diese Gewebsentzündung des Magens greift in die Regelung der Säureproduktion ein und verursacht durch Störung der Gastrin-produzierenden G-Zellen eine Hypergastrinämie, die mit dem Grad der Entzündungsreaktion assoziiert ist [31;104]. Gastrin wiederum wirkt als Wachstumsfaktor auf *Helicobacter pylori*, wodurch für den Keim eine positive Rückkopplung entsteht [30]. Als fremdartiger Organismus produziert *Helicobacter pylori* eine große Anzahl an Substanzen, welche als Antigene erkannt werden. Hitzeschockproteine, Lipopolysaccharide oder auch Enzyme wie die Urease werden von Makrophagen und aktivierten T-Lymphozyten aufgenommen und verarbeitet [49;123]. Bei der *Helicobacter pylori*-Infektion konnte auf molekularbiologischer Ebene gezeigt werden, dass neben IFN- γ , IL-12 und IL-18, vor allem IL-8 als inflammatorischer Mediator, eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie einnimmt [173;180;197;210;211]. So aktiviert das Bakterium den Transkriptionsfaktor NF- κ B, welcher wiederum die IL-8-Produktion fördert und somit den Entzündungsgrad der Magenmukosa steigert [37;39;112]. Auch TNF α , ebenfalls ein proinflammatorisches Zytokin, steigert die IL-8-Produktion des entzündeten Gewebes. Entsprechend zeigt eine erfolgreiche Eradikation parallel zur abnehmenden Entzündung, eine Reduzierung der TNF α - und IL-8-mRNA [133]. Der Befall der Magenschleimhaut durch *Helicobacter pylori* geht mit einer dichten Durchsetzung des Gewebes mit neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen einher. Diese Zellinfiltration wird neben IL-8 auch durch das sogenannte ENA-78 (Epithelial cell-derived neutrophil-activating protein 78) vermittelt. Dabei konnte von *Rieder et al.* [161] gezeigt werden, dass ENA-78-mRNA in infizierter Magenschleimhaut vorhanden und an der Granulozyten-Rekrutierung beteiligt ist.

Neben der T-Zellantwort kommt es bei der *Helicobacter pylori*-Infektion zu einer B-Zell-Aktivierung. Dabei können sowohl lokal in der gastroduodenalen Schleimhaut, als auch systemisch IgG- und IgA-Antikörper gemessen werden. Das Antikörperprofil verändert sich im Verlauf einer Infektion. Zu Beginn werden IgM-Antikörper, später dann IgG- und IgA-Antikörper produziert [127]. Die bei der *Helicobacter pylori*-Infektion auftretenden IgG-Antikörper tragen durch eine Komplement- und Granulozyten-Aktivierung zu einer verstärkten Entzündungsreaktion bei [128].

So korreliert bei Kindern der Titer der IgG-Subklasse 3 mit dem Auftreten von gastroduodenalen Ulzerationen [52]. Im Zusammenspiel zwischen B- und T-Lymphozyten scheint das Th1-Zytokin IFN- γ , welches an der Pathogenerkennung, der Antigenverarbeitung und -präsentation sowie am Leukozytenverhalten beteiligt ist, die zytotoxische Aktivität der Antikörper zu verstärken [21;90;213]. Darüber hinaus aktiviert IFN- γ antigen-präsentierende Zellen, Makrophagen und NK-Zellen, was seine zentrale Rolle in der Immunantwort gegen *Helicobacter pylori* unterstreicht [173]. *Monteleone et al.* [131] zeigten in einer Studie, dass IFN- γ die Expression des Proteins Smad7 induziert, welches im Rahmen der *Helicobacter pylori*-Infektion die Th1-vermittelte Gewebsschädigung des Magens unterhält. In Abwesenheit von IFN- γ ist die Aktivität der Entzündung in der Magenschleimhaut niedriger [185]. Vergleichsstudien hinsichtlich der Zytokin-Expression bei einer *Helicobacter pylori*-Infektion zeigen, dass IFN- γ bei Kindern signifikant niedriger exprimiert wird, als bei Erwachsenen. Diese Tatsache könnte ein Grund dafür sein, dass bei Kindern schwere Folgeerkrankungen im Magen und Duodenum seltener vorkommen [24].

1.2. Das Th1-/Th2-Modell anhand der Pathogenese der *Helicobacter pylori* - Infektion

Nachdem T-Zellen ihre Entwicklung im Thymus abgeschlossen haben, gelangen sie in die peripheren lymphatischen Organe. Von hier aus kehren sie in das Blut zurück, wo sie solange zirkulieren, bis sie auf Antigene treffen. Antigene, die von extrazellulären Bakterien, wie *Helicobacter pylori* abstammen, werden von MHC-Klasse-II-Molekülen an der Zelloberfläche Antigenpräsentierender-Zellen den CD4-T-Zellen präsentiert [99] (*Abb. 2a*). Die CD4-T-Zellen können u.a. zu zwei Arten von Effektorzellen differenzieren: inflammatorische T-Zellen (Th1-Zellen) und T-Helferzellen (Th2-Zellen) (*Abb. 2b*).

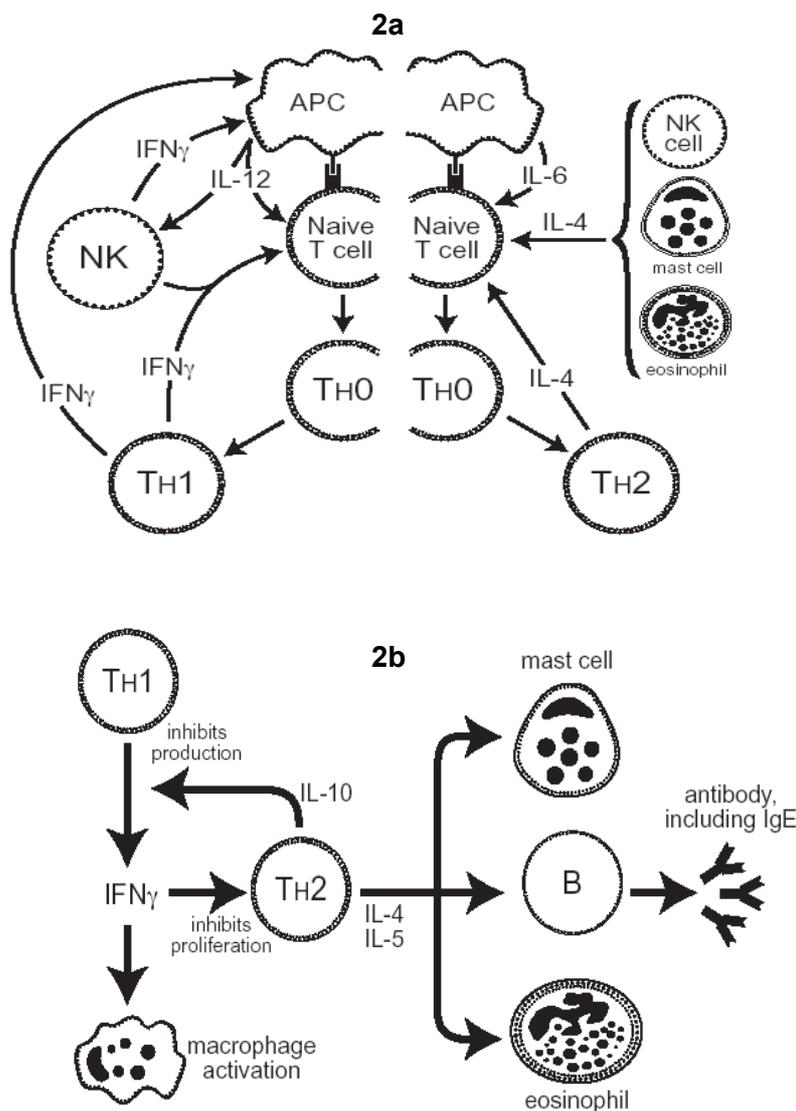


Abb.2a/b: Th1-/Th2-Modell. [Parris Kidd. *Th1/Th2 Balance: The hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. Alternative Medicine Review* 2003; 8(3): 223-246]

Th1- und Th2-Zellen können aufgrund des von ihnen sezernierten Zytokinmusters, und an der Oberfläche exprimierten Chemokinrezeptoren voneinander unterschieden werden. Chemokine sind kleine chemotaktisch wirksame Proteine, bestehend aus 70-130 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 7-10 kDa [110;175]. Derzeit sind mehr als 50 humane Chemokine bekannt [42;214]. Die strukturelle Einteilung der Chemokine erfolgt anhand ihrer NH₂-terminalen Cystein-Anordnung und unterscheidet vier Gruppen: C-, CC-, CXC- und CX₃C-Chemokine [114;133;162;171]. Chemokine werden anhand ihrer Funktion in „inflammatorische“ und „homeostatische“ Chemokine unterteilt [171]. Chemokine regulieren insbesondere die Leukozytenwanderung in gesundem und entzündlichem Gewebe [41]. Die Expression inflammatorischer Chemokine wird durch die von Monozyten, Makrophagen, Endothel- und Epithelzellen, oder Fibroblasten produzierten proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 und IFN- γ ,

oder durch bakterielle Zellwandbestandteile, wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS) ausgelöst [162;171]. Monozyten, neutrophile Granulozyten und T-Lymphozyten wandern entlang eines Gradienten inflammatorischer Chemokine [132;174] (*Abb. 2b*). Bei der *Helicobacter pylori*-Infektion ist in der Magenmukosa das T-Helferzellinfiltrat durch eine überschießende Th1-Immunantwort charakterisiert [12;16;43;56;89;108;186]. Th1-Zellen sind durch die Produktion von IFN- γ und IL-2, Th2-Zellen hingegen durch die Synthese von IL-4, IL-5 und IL-13 charakterisiert [114;132;162;171;175]. Eine Unterteilung der T-Helferzellen lässt sich nicht nur anhand der Zytokine vornehmen, sondern auch anhand von Chemokinrezeptoren. Diese sind G-Protein-gekoppelte, Pertussistoxin-sensitive Rezeptoren, die aus sieben Transmembran-Domänen aufgebaut sind [110;135]. Derzeit sind etwa 20 Chemokinrezeptoren bekannt, die insbesondere auf Leukozyten exprimiert werden [41]. Analog zu den Chemokinen werden zwei große Chemokin-rezeptorgruppen unterschieden: Die CC-Rezeptoren und die CXC-Rezeptoren. Im Allgemeinen kontrollieren die CC-Rezeptoren hauptsächlich die Monozyten- und T-Lymphozyten-Migration, wohingegen die CXC-Gruppe die Wanderung der neutrophilen Granulozyten steuert [9;115]. Ebenso wie Chemokine lassen sich die Chemokinrezeptoren entsprechend ihrer Funktion, in inflammatorische und homöostatische Rezeptoren unterteilen [132].

So werden beispielsweise CCR3, CCR4, CCR5, CCR8 und CXCR3 zu den inflammatorischen Chemokinrezeptoren gezählt. Davon werden CXCR3 und CCR5 bevorzugt auf Th1-Zellen, CCR3, CCR4 und CCR8 vor allem auf Th2-Zellen exprimiert [2;170;171]. Bei der *Helicobacter pylori*-Infektion konnte gezeigt werden, dass es in der Magenschleimhaut von infizierten im Vergleich zu nicht infizierten Kindern zu einer signifikanten Zunahme von CCR5-positiven Lymphozyten kommt [98]. Weiter wurde von *Yamaoka et al.* [211] gezeigt, dass der CCR5-Ligand MIP-1 α auf Protein- und mRNA-Ebene mit dem *Helicobacter pylori*-Status korreliert. Die Interaktion zwischen Chemokin und Rezeptor findet über die flexible NH₂-terminale Region und einer formbeständigen Schleife nach dem zweiten Cystein statt [32]. Dabei ist entscheidend, dass die meisten Chemokine an mehreren unterschiedlichen Rezeptoren und die meisten Rezeptoren wiederum mehr als ein Chemokin binden [162]. Dieses miteinander verflochtene Netzwerk erlaubt das Ungleichgewicht zwischen einer Vielzahl an Chemokinen und einer vergleichsweise geringen Rezeptoranzahl zu überwinden.

Neben den oben erwähnten Chemokinrezeptoren, gibt es weitere Rezeptortypen wie CRTH2 und die Toll-like-Rezeptoren TLR2 und TLR4, die bei der Regulation von Th1-/Th2-Immunantworten eine Rolle spielen. So wird CRTH2 insbesondere auf Th2-Zellen exprimiert und soll an der Pathogenese allergischer Erkrankungen beteiligt sein [35;105;136]. TLR2 und TLR4 hingegen spielen eine entscheidende Rolle in der Erkennung von gram-positiven (TLR2) sowie gram-negativen (TLR4) Bakterien und scheinen auch im Rahmen der *Helicobacter pylori*-Infektion eine Th1-vermittelte Immunantwort auszulösen [3;192].

Trotz der oben beschriebenen Grundzüge der angeborenen und adaptiven Immunantwort gegen *Helicobacter pylori* ist es dem Immunsystem kaum möglich, sich des Keimes von selbst zu entledigen. Eine antibiotische Kombinationstherapie ist die einzige Möglichkeit das Bakterium zu eradizieren. Zunehmend problematisch sind dabei die in den vergangenen Jahren vermehrt beobachteten antibiotikaresistenten *Helicobacter pylori*-Stämme bei Erwachsenen und bei Kindern [97;159]. Spontane Eradikationen ohne Therapie bleiben insbesondere bei Erwachsenen eine Seltenheit. Bei Kindern hingegen lassen Beobachtungen auf eine unterschiedlich verlaufende Immunantwort schließen. So wurden im Vergleich zu Erwachsenen deutlich häufiger spontane Eradikationen beobachtet [72]. In histologischen Vergleichsstudien zeigt sich bei Kindern mit einer *Helicobacter pylori*-induzierten Gastritis eine signifikant geringere Infiltration von Granulozyten und Lymphozyten sowie ein geringeres Ausmaß der Schleimhautatrophie [125]. Makroskopisch lassen sich ebenfalls Unterschiede entdecken: Eine bei Kindern regelmäßig endoskopisch nachzuweisende Nodularität, die eine gänsehautähnliche Magenschleimhaut beschreibt, ist bei älteren Patienten nur gelegentlich zu sehen [64]. Diese nodulären Schleimhautveränderungen, welche lymphatischem Gewebe entsprechen, sind laut neueren Studien als ein wichtiger Marker einer aktiven Gastritis des Kindes zu deuten [112;200]. Dennoch scheinen bei Kindern, insbesondere aufgrund der unterschiedlichen Produktion entzündlicher Mediatoren sowie unterschiedlicher bakterieller Virulenzfaktoren, schwere gastrointestinale Komplikationen, wie etwa das *Helicobacter pylori*-assoziierte Ulkus deutlich seltener aufzutreten [29].

2. Zielsetzung

In der folgenden Arbeit sollten nachstehende Fragen zur Immunantwort beantwortet werden:

- Welche Th1/Th2-assoziierte Zytokine und Chemokinrezeptoren sind in unstimulierten Antrumbiopsien von Kindern nachweisbar ?

- 2. Zeigen *Helicobacter pylori*-infizierte Kinder ein anderes Chemokin- und Chemokinrezeptor-Expressionsmuster als nicht infizierte Kinder ?

- 3. Korrelieren Th1- bzw. Th2-assoziierte Zytokine mit Th1- bzw. Th2-assoziierten Chemokinrezeptoren ?

- 4. Korreliert die Zytokin- und Chemokinrezeptor-Expression infizierter Magenschleimhaut mit dem Entzündungsgrad der Erkrankung ?

- 5. Sind die sogenannten Toll-like-Rezeptoren 2 und 4 an der Pathogenese der *Helicobacter pylori*-Infektion beteiligt ? Hierbei stellt sich die Frage, ob in Antrumbiopsien von *Helicobacter pylori*-infizierten Kindern TLR2 und TLR4 nachweisbar sind und falls ja, ob sich die Expression von Kindern mit Zöliakie bzw. GÖR unterscheidet.

3. Material und Methoden

3.1. Patienten und Gruppeneinteilung

Kinder mit unterschiedlichen gastrointestinalen Beschwerden wurden im Zeitraum von 1999 bis 2004 in der Gastroenterologischen Abteilung des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität München (Leitung: Frau Prof. Dr. med. S. Koletzko) endoskopiert. Indikationen für eine Endoskopie waren: chronisch-rezidivierende Bauchschmerzen, häufiges Erbrechen, Refluxsymptomatik, Gedeihstörungen, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen oder Zöliakie. Unter Einwilligung der Eltern wurden zusätzliche Magenbiopsien zur Untersuchung der Immunantwort entnommen.

Die für die Studie in Frage kommenden Patienten wurden anhand klinischer, endoskopischer, mikrobiologischer und histologischer Befunde ausgewählt und in drei Gruppen eingeteilt. Ausschlusskriterien für alle Kinder waren: Einnahme von Antazida, Steroiden, Antibiotika oder nicht-steroidalen Antiphlogistika vier Wochen vor der Endoskopie, sowie erworbene oder angeborene Immundefekte. An Gruppengröße sollte ein möglichst ausgeglichenes Verhältnis herrschen.

Der **Patientengruppe 1** wurden diejenigen Kinder zugeteilt, bei denen eine *Helicobacter pylori*-Infektion nachgewiesen werden konnte. Dabei ist ein positiver *Helicobacter pylori*-Status folgend definiert:

- Positive kulturelle Anzucht des Keimes (Max v. Pettenkoferinstitut)
- und / oder 2 von 3 der aufgeführten diagnostischen Testungen sind positiv:
- positiver ¹³C-Harnstoff-Atemtest
 - positiver histologischer Nachweis
 - positiver Urease-Schnelltest (HUT)

Die übrigen Kinder, bei denen alle durchgeführten Tests negativ waren und sie somit als *Helicobacter pylori*-negativ klassifiziert wurden, wurden weiterhin in eine magengesunde Kontrollgruppe (Patientengruppe 2) und einer sogenannten „disease control“ (Patientengruppe 3) eingeteilt.

In die **Patientengruppe 2** wurden Kinder mit der Diagnose „Normalbefund“ und „Gastro-ösophageale Refluxkrankheit“ (GÖR) gemäß der Savary-Miller-Klassifikation [172] eingeteilt.

Folgende klinische Parameter mussten bei diesem Patientenkollektiv ausgeschlossen sein: bereits stattgehabte *Helicobacter pylori*-Infektion, Zöliakie und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen.

Der **Patientengruppe 3**, welche als „disease control“ definiert wurde, wurden Kinder mit der Diagnose „Zöliakie“ zugeteilt. Zur Diagnosestellung wurde zunächst im Patientenserum der Antikörperstatus von Endomysium-Ak und Gewebstransglutaminase-Ak gemessen. Bei einem positivem Endomysium-Ak-Titer von über 1:2,5 bzw. einem Transglutaminase-Ak-Titer von >10 wurde der Patient biopsiert. Das histologische Dünndarmpräparat wurde nach der Marsh-Einteilung klassifiziert und musste charakteristische Schleimhautveränderungen, wie Zottenatrophie, Kryptenhyperplasie, sowie vermehrte plasmazelluläre und lymphozytäre Zellinfiltration des Epithels aufweisen (Marsh II oder III a-c) [143].

3.2. Endoskopie und Materialgewinnung

Die Ösophago-Gastro-Duodenoskopie (ÖGD) wurde in Analgo-Sedierung oder Intubationsnarkose unter Verwendung des Endoskops „Olympus GIF PQ 20“ durchgeführt. Im Rahmen der ÖGD wurden folgende anatomische Strukturen untersucht: Ösophagus, Magen (Kardia, Corpus, Antrum) und das Duodenum bis zur pars descendens. Dabei wurden insbesondere Erytheme, Erosionen, Ulzerationen, sowie auf das Vorhandensein einer nodulären Geweboberfläche im Magen und Duodenum dokumentiert. Neben der endoskopischen Beurteilung erfolgte bei jedem Patienten eine histologische Untersuchung, wofür insgesamt vier Gewebeproben mit jeweils zwei Proben aus Antrum und Corpus mittels Zangenbiopsie entnommen wurden. Für die mikrobiologische Untersuchung und den Urease-Schnelltest wurden zwei weitere Biopsien aus dem Antrum entnommen. Zusätzlich zu den Routineparametern wurde eine Antrumbiopsie für molekularbiologische Bestimmungen entnommen. Patientenproben, welche für die histologische Untersuchung vorgesehen waren, wurden formalinfixiert (37%) zur histologisch-pathologischen Begutachtung dem Pathologischen Institut der LMU München übersandt.

Der Nachweis von *Helicobacter pylori* erfolgte hierbei anhand einer modifizierten Giemsa-Färbung des Präparates, mit anschließender Klassifikation nach den Sydney-Kriterien [126]. Biopsien für die kulturelle Anzucht wurden in ein Transportmedium (Portagerm Pylori®) gegeben und zum Max-von-Pettenkofer-Institut für Mikrobiologie/Virologie verschickt. Die Biopsien für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden unmittelbar nach der Probenentnahme kryokonserviert. Hierfür wurden die Präparate sofort auf Trockeneis (-50°C) schockgefroren und in 0,25ml Tissue-Tek eingebettet. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurden die Biopsien in Alufolie eingewickelt und bis zur weiteren Verarbeitung in einem Gefrierschrank bei -80°C gelagert. Als Ausschlusskriterium wurde z.B. unbrauchbares Untersuchungsmaterial infolge unzureichender Kryokonservierung festgelegt.

3.3. Diagnostische Nachweisverfahren von *Helicobacter pylori*

3.3.1. ¹³C-Harnstoff-Atemtest

Der ¹³C-Harnstoff-Atemtest wurde als etabliertes Verfahren zum nicht-invasiven Nachweis einer *Helicobacter pylori*-Infektion durchgeführt. Der Atemtest macht sich die Ureaseaktivität des *Helicobacter pylori*, die Harnstoff zu CO₂ und NH₂ abbaut, zunutze. Dabei werden dem Patienten 75mg ¹³C-markierter Harnstoff in 200ml kaltem Apfelsaft verabreicht. Nach jeweils 15 und 30 Minuten wird der ¹³CO₂-Gehalt anhand einer Atemprobe spektrometrisch bestimmt und mit einem Leerwert, welcher vor Testbeginn bestimmt worden ist verglichen [96]. Ab einem 30 Minutenwert von 5‰ ist der Patient als *Helicobacter pylori*-positiv zu werten.

3.3.2. Histologie

Zur histologischen Beurteilung der Magenbiopsien wurde die Sydney-Klassifikation herangezogen [126]. Die Beurteilung bezieht folgende Kriterien ein:

- die Infiltration mit neutrophilen Granulozyten als Maß für die Aktivität der Entzündung (Aktivitätsgrad 1[+], 2[++], 3[+++]).
- die Infiltration mit Lymphozyten und Plasmazellen als Grad für die Chronizität der Entzündung

- die Atrophie des Drüsenkörpers der Schleimhaut
- das Vorkommen intestinaler Metaplasien
- das Ausmaß der Besiedlung mit *Helicobacter pylori*

3.3.3. Urease-Schnelltest

Der Urease-Schnelltest ist ein invasives Verfahren, das sich wie der Atemtest der Urease-Aktivität des *Helicobacter pylori* zunutze macht. Endoskopisch gewonnene Gewebeproben werden in eine 2-6%-harnstoffhaltige Gelatine gebettet (HUT-Test®) und bei 37°C für 20 Minuten inkubiert. Befinden sich mehr als 10.000 Keime in der Biopsie, so kommt es durch die bakterielle Ureaseaktivität zur Ammoniak-Freisetzung und einer pH-Verschiebung vom neutralen in den alkalischen Bereich. Durch beigefügte Indikatoren wird diese Alkalisierung anhand eines Farbumschlages sichtbar gemacht. Mit einer Sensitivität und Spezifität von etwa 95% wird der Test nach etwa einer Stunde abgelesen [140].

3.3.4. Kultur

Die kulturelle Anzucht des *Helicobacter pylori* ist mit einer 100%-igen Spezifität zwar sehr aussagekräftig, aber gleichzeitig durch die Empfindlichkeit des Keimes gegenüber Sauerstoff und warmen Temperaturen sehr schwierig. Zur Anzucht des Keimes ist ein Spezialnährboden erforderlich, das Serum, Antibiotika zur Unterdrückung der Begleitflora, sowie Amphotericin B gegen Schimmelpilzkontamination enthält. Bei 37°C und mikroaerophilen (5% O₂) Bedingungen dauert die durchschnittliche Bebrütung etwa 5 Tage. Die Kolonien sind mit einem Durchmesser von etwa 1mm relativ klein, glatt begrenzt, durchsichtig und zeigen Betahämolyse. Durch eine Gramfärbung wird die endgültige Diagnose gestellt.

3.4. RNA-Isolation aus Magengewebe

Die Isolierung intakter RNA ist eine Grundvoraussetzung zur Analyse der Genexpression, wobei intakte und degradierte RNA für die RT-PCR benötigt wird. Die RNA-Extraktion aus humanem Magengewebe erfolgte mit dem High Pure RNA Tissue Kit (Roche Molecular Biochemicals) (Abb. 3). Hierfür wurden die Gewebeprobe mit Guanidinium-HCl-haltigem Puffer (400µl Lyse/Bindepuffer) zerkleinert und homogenisiert. Das Lysat wurde für 2 Minuten (13.000 x g) zentrifugiert. Nach Zugabe von 200µl absolutem Ethanol zum Lysatüberstand und erneuter Zentrifugation für 30 Sekunden (13.000 x g), bindet die RNA selektiv an ein Glasfaservlies spezieller Filtrationsgefäße. Der Durchlauf wurde anschließend verworfen und kontaminierende genomische DNA mit 90µl DNase-Inkubationspuffer (1M NaCl; 20mM Tris-HCl; 10mM MnCl₂; pH 7,0) und 10µl DNase I verdaut. Die gebundene RNA wurde anschließend gewaschen, wodurch sich Salze, Proteine und zelluläre Verunreinigungen abtrennen sollen. Hierfür wurden im ersten Waschgang 500µl des sogenannten Waschpuffer I (5M Guanidinium-HCl; 20mM Tris-HCl; pH 6,6) verwendet und anschließend nach Zentrifugation (15sec. 8.000 x g) der Überstand verworfen. Im zweiten (500µl) und dritten (300µl) Waschgang wurde die RNA mit dem Waschpuffer II (20mM NaCl; 2mM Tris-HCl; pH 7,5) behandelt. Der Überstand wurde nach zwei Waschsritten (15sec. 8.000 x g; 2min. 13.000 x g) verworfen. Die gereinigte RNA wurde mithilfe eines Elutionspuffers (nukleasefreies, steriles aqua bidest.) eluiert und zentrifugiert (1min 8.000 x g). Die eluierte RNA wurde sofort in cDNA umgeschrieben.

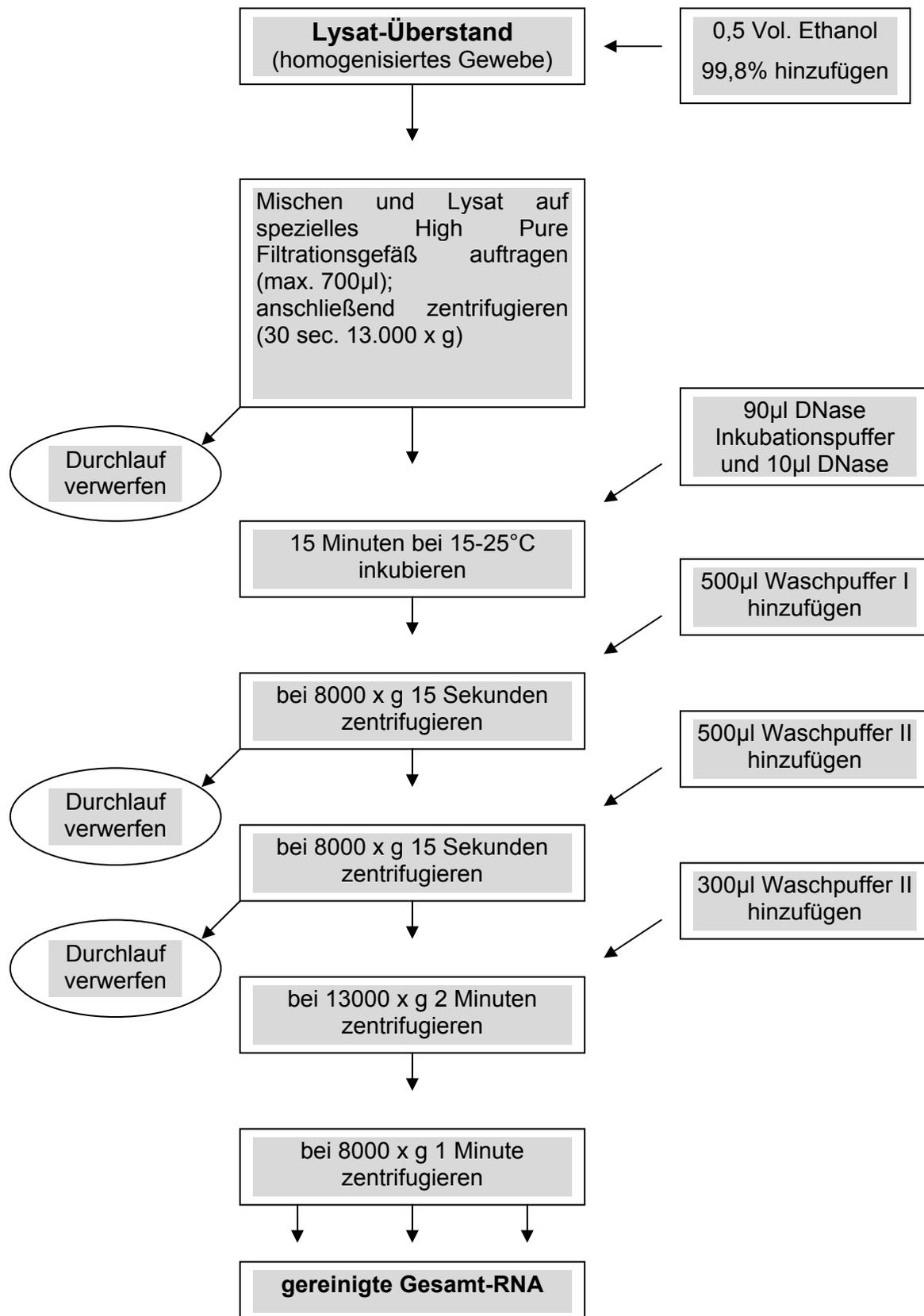


Abb. 3: Fließschema der RNA-Isolation aus Gewebe mit dem High Pure RNA Tissue Kit von Roche Molecular Biochemicals.

3.5. Reverse-Transkription

Für die cDNA-Synthese wurde die Reverse-Transkriptase (RT) verwendet. Dieses Enzym erlaubt als RNA-abhängige DNA-Polymerase die Umschreibung von RNA in DNA. Hierbei entsteht initial ein RNA/DNA-Hybridmolekül. Um mit der Strangsynthese beginnen zu können, benötigt die Reverse-Transkriptase kurze doppelsträngige Nukleinsäurebereiche. Hierzu dienen zufällig an die RNA angelagerte Hexanukleotide, an deren 3' Enden die Reverse-Transkriptase bindet. Diese Herstellungsweise der cDNA basiert auf der von Feinberg und Vogelstein 1983/84 entwickelten Methode der „random primed“ DNA-Markierung [58]. Bei dem als Primer dienenden Hexanukleotid-Mix sind praktisch alle Basensequenzkombinationen enthalten, so dass eine Bindung an die RNA als eingesetztes Ausgangsmaterial möglich wird. Der komplementäre Strang wird von den 3'-Enden der „random primer“ mit Hilfe des sogenannten Klenow-Enzyms synthetisiert. Dabei werden die als Substrat angebotenen Desoxyribonukleosidtriphosphate in den neu synthetisierten DNA-Strang komplementär eingebaut.

Für die Reverse-Transkription wurden im ersten Arbeitsschritt 20µl der gereinigten RNA mit 3µl Aqua ad iniectabilia und 2µl des Hexanukleotid-Mix (10-fach konzentriert) gemischt und in einem PCR-Gerät bei 70°C für 10 Minuten inkubiert. Im zweiten Schritt wurde auf Eis je Probe folgendes Reaktionsgemisch zugefügt:

- 4,5µl Aqua ad iniectabilia
- 10,0µl 5x Puffer
- 5,0µl DTT (0,1M)
- 2,5µl dNTP (10mM)
- 1,0µl Rnasin
- 2,0µl Superscript II (=Reverse Transkriptase)

Die Umschreibung in die cDNA erfolgte bei 42°C über 70 Minuten, der ein Denaturierungsvorgang bei 95°C für 5 Minuten angeschlossen war. Die synthetisierte cDNA wurde anschließend bei -20°C im Gefrierschrank gelagert und stand nun für die Real-Time-PCR zur Verfügung. Zur Qualitätskontrolle der cDNA-Synthese wurden neben den Reverse Transkriptase(RT)-positiven Proben, auch RT-negative Proben zubereitet.

Hierbei wurden dem oben aufgeführten Reagenzgemisch statt der 2,0µl Superscript II, 2,0µl aqua ad iniectabilia hinzugegeben. Dadurch soll eine Reverse Transkription der hinzugegebenen Matrize ausbleiben und eine Kontamination der cDNA mit genomischer DNA kontrolliert werden. Die Umschreibung der RNA in cDNA bleibt aus, so dass bei der späteren spezifischen PCR kein Produkt entsteht. Erscheint dennoch ein PCR-Produkt, so beweist das die Kontamination mit genomischer DNA.

3.6. Real-Time-PCR

3.6.1. Grundlagen der PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation geringer Nucleinsäuremengen aus den unterschiedlichsten Ausgangsmaterialien [168]. Das Prinzip der PCR basiert grundlegend auf drei Reaktionsschritten (*Tab. 1*):

| Reaktionsschritt | Temperaturspektrum |
|---------------------------------------|--------------------|
| Denaturierung des Templates | 92-95°C |
| Annealing der Oligonukleotide | 50-60°C |
| Elongation der Oligonukleotide | 68-75°C |

Tab. 1: PCR-Reaktionsschritte

Der DNA-Doppelstrang wird zunächst durch Erhöhung der Temperatur auf 90°C denaturiert. Als nächstes lagern sich im Annealing-Vorgang am 5'- und 3'-Ende des zu amplifizierenden Bereiches zwei aus etwa 15 bis 20 Basen bestehende Oligonukleotide, sogenannte Primer an. Während der Elongation werden die angelagerten Oligonukleotide von einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase in Anwesenheit freier Desoxynucleosid-Trisphosphate (dNTP's) verlängert. Da die DNA-Polymerasen bereits bei niedrigeren Temperaturen (<70°C) mit der Elongation beginnen können und dadurch unspezifische Amplifikate entstehen, entwickelte man zur Optimierung die sogenannte „Hotstart-PCR“. Dabei kommen Polymerasen zum Einsatz, die ihre Elongationsaktivität erst nach einem initialen Erhitzen (95°C) erhalten. Die DNA-Polymerase elongiert den entstehenden DNA-Doppelstrang so lange, bis sie von der DNA „abfällt“ oder die Reaktion unterbrochen wird. Dieser Abbruch kann beispielsweise durch eine Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 95°C herbeigeführt werden, wodurch erneut eine Denaturierung der dsDNA erfolgt.

Wird nun der Ansatz in Anwesenheit freier Oligonukleotide auf 60-40°C heruntergekühlt, so binden sich diese in Abhängigkeit ihres mittleren Schmelzwertes an die komplementären Sequenzen der DNA-Matrize. Wird dieser Reaktionszyklus mehrfach wiederholt, so ergibt sich eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA-Moleküle. Mit 25 PCR-Zyklen können aus einem Zielmolekül theoretisch $3,2 \times 10^7$ Kopien synthetisiert werden. Bei 30 Zyklen erhält man unter optimalen Bedingungen bis zu 10^9 Kopien der Ausgangssubstanz. Bei mehr als 30 Zyklen steigert sich das Risiko, dass unspezifische Fragmente amplifiziert werden. Das Schlüsselenzym der PCR ist die sogenannte DNA-Polymerase. Seit der Entdeckung und Isolierung der thermostabilen DNA-Polymerase des Bakterienstammes „*Thermus-aquaticus*“, wird die sogenannte Taq-DNA-Polymerase für etwa 90% aller PCRs verwendet [101]. Diese Taq-Polymerase, welche bis zu 6.000 Basenpaare amplifiziert, besitzt eine 5' → 3' Syntheserichtung und benötigt als Startmolekül einen dsDNA-Bereich mit intaktem 3'-OH Ende. Neben der DNA-Polymerase ist für eine effektive Polymerase-Kettenreaktion ein geeigneter PCR-Puffer nötig. Mit diesem Puffer wird ein für die Polymerase optimales Milieu geschaffen. Als Grundkomponenten aller PCR-Puffer werden Cl⁻-Ionen, Mg²⁺-Ionen und dNTPs verwendet. Magnesiumchlorid ist metabolischer Cofaktor der DNA-Polymerase, der die Enzymaktivität beeinflusst. Die dNTPs dienen als Substrate. Nach Komplexbildung mit Mg²⁺-Ionen werden sie in Abhängigkeit der Basenpaarungsregelung an den zugehörigen freien 3'-Enden des zu synthetisierenden Stranges verknüpft. Zum PCR-Ansatz zählen auch die Oligonukleotidmoleküle (Primer), die in der Regel in hohem Überschuss (bis 2µM) hinzugegeben werden. Geringe Primermengen führen zu einer niedrigen Ausbeute. Bei zu hohen Konzentrationen hingegen, kommt es zu Fehlpaarungen und somit zu unspezifischen PCR-Produkten. Die Länge der Oligonukleotide sollte zwischen 12 und maximal 50 Basen liegen. Je größer das zu amplifizierende DNA-Fragment, desto länger sollten auch die Primer sein. Bei der Konstruktion von Primern muss das Basenpaarverhältnis G/C zu A/T annähernd gleich sein. Der Anteil von G/C soll dabei 40-60% betragen. Jeder Primer hat eine spezifische Annealing-Temperatur, bei der er sich an die Ziel-DNA anlagert.

3.6.2. Real-Time RT-PCR

Nach etwa 25-30 Zyklen gestaltet sich die Quantifizierung des PCR-Produktes schwierig, da die Zunahme des PCR-Produktes nicht mehr linear erfolgt. Deshalb wurden verschiedene optische PCR-Systeme zur Online-Beobachtung des Amplifikationsstatus etabliert. Diese Polymerase-Kettenreaktion wird als Real-Time-PCR bezeichnet, da die Quantität der amplifizierten Matrizen direkt abgelesen werden kann [62]. Als Detektionshilfsmittel werden Fluorophore verwendet, die als fluoreszierende Moleküle an Oligonukleotide gekoppelt sind. Das generelle Prinzip der Detektion basiert auf Anregung (Extinktion) der eingesetzten Fluorophore durch kurzwelliges Licht, worauf höherwelliges Licht emittiert wird. Diese Emission wird von optischen Detektoren für jeden einzelnen Zyklus gelesen und die Fluoreszenzintensität ausgewertet. Hierbei ist die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Menge doppelsträngiger DNA in der jeweiligen Messprobe. Da die Sensitivität der Polymerase-Kettenreaktion hoch ist, genügen geringe Mengen (<1pg) an Ausgangsmaterial, um eine erfolgreiche Amplifikation zu erzielen. Die PCR eignet sich daher als Detektionsmethode, um beispielsweise aus humanen Magenzellen die Expression verschiedenster Zytokine, Chemokine und Chemokinrezeptoren zu bestimmen.

Für die quantitative Auswertung wurde als PCR-System der sogenannte iCycler iQ von Biorad Laboratories mit einem Fluoreszenzspektrum für Extinktion und Emission von 400-700nm verwendet. Als Fluorophor wurde SYBR*Green* mit einem Extinktionswert von 488nm und einer Emission von 520nm eingesetzt. Zum Nachweis von dsDNA interkaliert SYBR*Green* zwischen doppelsträngige Nukleinsäuren und emittiert darauf unter Anregung von kurzwelligem Licht, längerwelliges Licht. Für einen 25µl Ansatz (= 1 Probe) wurden verwendet:

| | |
|---|-------|
| ○ SYBR <i>Green</i> -Mix (incl. Taq-Polymerase) | 10µl |
| ○ Aqua ad iniectabilia | 5µl |
| ○ cDNA | 2µl |
| ○ Sense-Primer | 4µl |
| ○ Antisense-Primer | 4µl |
| | <hr/> |
| | 25µl |

Das Reaktionsgemisch wurde wie folgt amplifiziert (*Abb. 4*):

| | | |
|-----------------------------|----------------------|---------------|
| ○ Denaturierung: | | 93°C - 5min |
| ○ 37-40 Zyklen: | Denaturierung | 95°C - 30s |
| | Primerhybridisierung | 55-58°C - 30s |
| | Synthese | 72°C - 45s |
| ○ Endpolymerisation: | | 72°C - 1min |
| | | 95°C - 1min |
| | | 55°C - 30s |
| | | 4°C |

Abb. 4: verwendetes Amplifikationsprogramm am iCycler iQ

Als Negativkontrolle wurden statt cDNA 2µl aqua ad iniectabilia mitgeführt. Für jedes Primerpaar wurden unterschiedliche Annealing-Temperaturen zwischen 50°C und 62°C getestet. Die optimale Primerhybridisierung erfolgt dabei bei der Temperatur mit der höchsten mRNA-Expression. Im Allgemeinen kann die Annealing-Temperatur vom Schmelzpunkt der Primer abgeleitet werden. Die Schmelztemperatur (T_m -Wert) bezeichnet die Temperatur, bei der 50% der Primer an die Template DNA gebunden sind. Dieser T_m -Wert lässt sich nach der *Wallace-Regel* berechnen, wobei die Schmelztemperatur von Länge und Sequenz des Primers abhängig ist. Die Formel lautet wie folgt: $T_m = 2^\circ\text{C} \times (A+T) + 4^\circ\text{C} \times (C+G)$. Zieht man nun von der Schmelztemperatur 2-5°C ab, so bekommt man einen Anhaltspunkt für die zu verwendende Annealingtemperatur. In Abhängigkeit von Zyklenzahl und der gemessenen Fluoreszenz-Emission ergibt sich für die PCR-Quantifikation folgende in *Abbildung 5* dargestellte Grafik. Hierbei ist die Quantität der amplifizierten Matrizen von Zyklus zu Zyklus direkt am Computerbildschirm abzulesen. Zur Berechnung einheitlicher Schwellenwerte musste die sogenannte PCR Base Line (*dicker Pfeil*) für alle PCR-Läufe auf gleicher Höhe positioniert werden. Dabei ist ein Fluoreszenzniveau festzulegen, bei dem sich alle Proben in der exponentiellen Phase der Amplifikation befinden. Zur Quantifizierung der einzelnen Proben wurde der Messpunkt C_t als der Zyklus definiert, an dem die Fluoreszenz das 10-fache der Standardabweichung der Hintergrundfluoreszenz überschreitet. Je früher es dabei zu einer signifikanten Zunahme der Fluoreszenz kommt, desto mehr cDNA war in der Ausgangsprobe vorhanden.

Sechs Amplifikate lassen sich an diesem Beispiel graphisch ablesen. Dabei ist zu erkennen, dass die Negativkontrolle (*dünner Pfeil*) den vorgesehenen Schwellenwert nicht überschreitet, während die jeweiligen Amplifikate ab einer bestimmten Zykluszahl exponentiell ansteigen, um dann in eine stationäre log-Phase überzugehen.

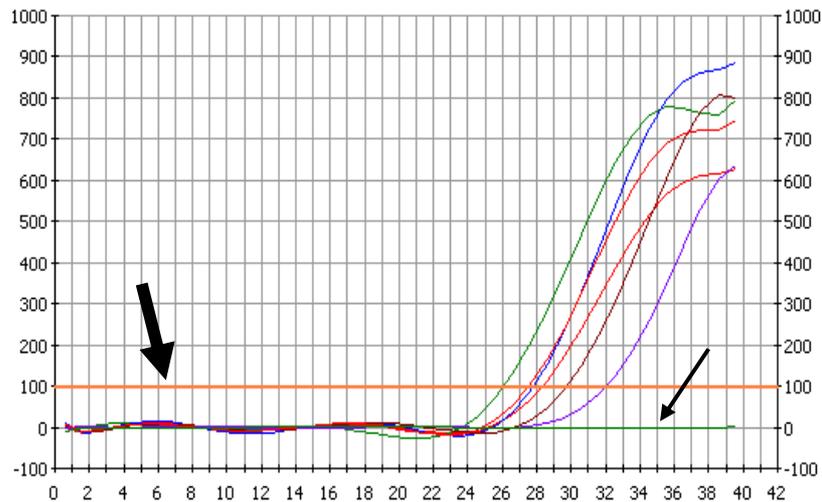


Abb. 5: PCR Quantifikation von GAPDH am iCycler iQ

Im Anschluß an die PCR wird die Spezifität des Produktes durch eine Schmelzkurvenanalyse überprüft. Das amplifizierte Produkt wird hierbei in 0,1°C Schritten bis auf 95°C erhitzt. Abhängig von der Produktlänge und -sequenz, sowie dem GC-Gehalt des Fragmentes, trennt sich der Doppelstrang bei einer für das Produkt spezifischen Temperatur auf. Dabei kommt es zu einem Abfall der Fluoreszenz, welche vom Gerät gemessen und grafisch ausgewertet wird (*Abb.6*).

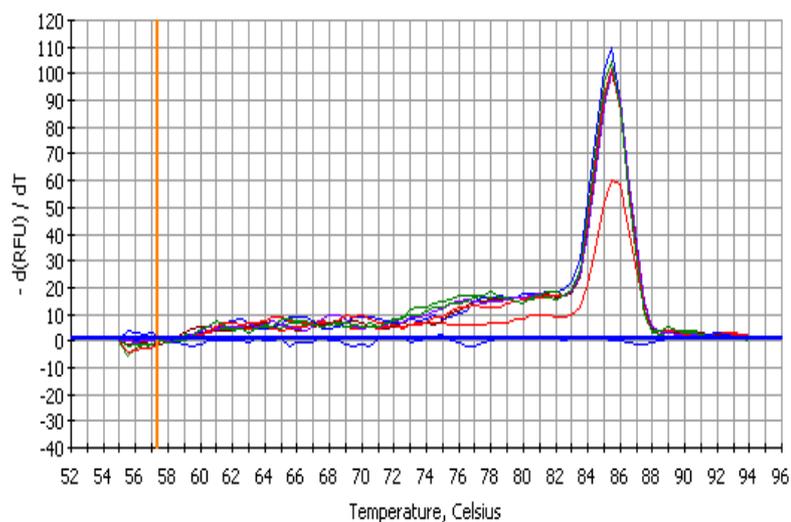


Abb. 6: GAPDH-Schmelzkurvenanalyse

Um diese Schmelzkurve besser abbilden zu können, wurden die Daten konvertiert. Die Änderung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Temperatur (dargestellt als negative 1. Ableitung der Fluoreszenz zur Temperatur $-dF/dT$) wird dabei gegen die Temperatur aufgetragen. Es entsteht eine Spitze, die sogenannte „melting peak“, mit einer für jedes Produkt spezifischen Temperatur. Die Fläche unter dem Graph ist der Menge an gebildetem Produkt proportional. Das relative Maß an PCR-Produkten wurde als Verhältnis von Zielmolekül-mRNA zu GAPDH-mRNA berechnet und als Median aller erhobenen Daten angegeben.

Als Ausschlusskriterien wurden bei den Patienten A1-A39 festgelegt: fehlender oder ungenügender Nachweis von mRNA in der Real-Time-PCR, Expressionsnachweis bei Reverse Transkriptase-negativen Patientenproben, Nachweis von genomischer DNA und/oder Primer-Dimeren in der Gelelektrophorese. Zur Überprüfung der Spezifität ließen wir jedes einzelne Amplikon einmal in einem auswärtigen Speziallabor sequenzieren.

3.7. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Charakterisierung des PCR-Produktes wurde zusätzlich zur Schmelzkurvenanalyse und DNA-Sequenzierung eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hierdurch lassen sich Reinheit und Spezifität des amplifizierten Produktes überprüfen. Da es sich bei den Produkten um DNA-Fragmente von über 100 Basenpaaren handelte, erfolgte die DNA-Auftrennung mit Bestimmung des Molekulargewichtes in einem 2,5% Agarosegel. Hierbei wurde ein elektrisches Feld verwendet, um die negativ geladenen DNA-Moleküle durch das Agarosegel zu ziehen, welches sich aus glykosidisch verzweigter D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalaktose zusammensetzt. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird durch verschiedene Faktoren, wie die Molekülgröße, die DNA-Konformation, die Agarosekonzentration und die angelegte Gleichspannung beeinflusst. Kleine DNA-Fragmente wandern schneller in Richtung der positiv geladenen Anode als große DNA-Moleküle. Gleich große Moleküle laufen als sogenannte „Banden“ durch das Gel. Lineare, doppelsträngige DNA-Fragmente bewegen sich im Agarosegel indirekt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes.

Anhand einer sogenannten „DNA-Leiter“, aus DNA-Fragmenten definierter Länge, die parallel zu den Amplifikaten im Agarosegel aufgetrennt wurden, konnte die Größe der Reaktionsprodukte beurteilt werden. Zur Darstellung der DNA-Fragmente wurde Ethidiumbromid [$C_{21}H_{20}BrN_3$] mit einem Molekulargewicht von 394 kDa verwendet, welche zwischen die Basen der DNA interkaliert und unter dem UV-Licht eines Transluminators bei 366 nm fluoresziert. Die Quantifizierung der im Agarosegel sichtbaren Banden erfolgte mittels des Geldokumentationssystemes „Diana 1.6“.

Bei der Durchführung der Gelelektrophorese sind folgende Arbeitsschritte vorzunehmen:

- 2,5 g Agarose in 100ml TAE-Puffer für 2 Minuten in Mikrowelle aufkochen
- 5µl Ethidiumbromid hinzugeben und gut mischen
- nach Abkühlung auf ca. 50-60°C Agarosegel luftblasenfrei in einen vorbereiteten Gelträger mit Kamm gießen
- nach Erstarren des Gels (Dauer: ca. 20-30 Minuten) Kamm vorsichtig herausziehen
- Gelträger in eine Pufferkammer einsetzen und mit TAE-Puffer überschichten
- zuvor vorbereitete DNA-Proben (1:5 vorverdünnt) mit 20% BPB-Ladungspuffer (10x Blue luice) versetzen und 10µl sorgfältig in Geltaschen pipettieren
- parallel zu den vorbereiteten PCR-Amplifikaten in erster und letzter Geltasche 10µl DNA-Marker XIII (50 Basenpaare) pipettieren
- Gel bei 90 Volt Spannung ca. 45-60 Minuten, bis kleinste Moleküle fast das Ende des Gels erreicht haben laufen lassen
- Agarosegel vorsichtig aus Gelträger entnehmen und in die vorgesehene Kameravorrichtung des Diana 1.6 Geldokumentationssystemes legen
- mittels Computersystem Einstellungen von Bildgröße, -schärfe und -farbe vornehmen und speichern

3.8. Auswertungsverfahren

Zur semiquantitativen Expressionsanalyse erfolgte die Berechnung der Verhältnisse von Zielmolekül-mRNA zu Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase- (GAPDH) mRNA. GAPDH fungiert hierbei als sogenanntes „housekeeping“-Gen, welches als Schlüsselenzym der Glykolyse konstant in jeder Zelle exprimiert wird und somit als interne RNA-Referenz für die quantitative Real-Time-PCR verwendet werden kann. Die Darstellung der errechneten Mittelwerte und Mediane werden als Reziprokwerte der Verhältnisberechnungen von Molekül zu GAPDH angegeben. Je höher die Werte, desto höher die Expression. Proben, welche mit DNA verunreinigt wurden oder eine Inter-Assay Variabilität von über 20% aufwiesen, wurden aus der Expressionsanalyse ausgeschlossen. Pro auszuwertendes Molekül wurden in der Real-Time-PCR mehrere Amplifikationsläufe durchgeführt.

Zur Überprüfung der Nullhypothese, dass sich mehr als zwei Gruppen nicht in der Verteilung einer Zielvariablen unterscheiden, wurde der nicht-parametrische *Kruskal-Wallis-Test* eingesetzt. Da bei der vorliegenden Patientenzahl keine Normalverteilung der Daten anzunehmen war, wurden die Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen, als Vergleich zweier unverbundener Stichproben, mit dem *Mann-Whitney-U-Test* (Wilcoxon-Rangsummentest) berechnet. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt. Die graphische Darstellung erfolgte in Form von „scatter dot blots“ (=Streudiagramme), welche die Verteilung der Mittelwerte (MW) und der Mediane der einzelnen Patienten anzeigt.

Korrelationen zwischen stetigen Variablen wurden mit dem nicht-parametrischen *Spearman-Rho-Korrelationskoeffizienten* (r) ermittelt. Hiermit lässt sich ein Maß für den linearen Zusammenhang zwischen zwei Variablen bestimmen. Der Wertebereich des sogenannten Korrelationskoeffizienten (r) liegt zwischen -1 und $+1$. Das Vorzeichen des Koeffizienten gibt die Richtung des Zusammenhanges, sein Absolutwert die Stärke an. Größere Absolutwerte deuten auf einen stärkeren Zusammenhang hin. Eine positive Korrelation wurde bei $r > 0.3$ angenommen.

Für die statistischen Berechnungen wurde das Programm „*Statistical Package for Social Sciences*“ (SPSS) Version 12.0 für Windows XP verwendet.

3.9. Geräte

- | | |
|---|----------------------------|
| ○ Abzugshaube Typ 4000 A | Captair, North Andova |
| ○ Easy-Cast Elektrophoresis System B 2 | Owl Scientific, Portsmouth |
| ○ Eismaschiene | Uniequip, München |
| ○ Elektrophorese-Kämme | Owl Scientific, Portsmouth |
| ○ Elektrophoresis Power-Supply PowerPac 200 | Biorad, Hercules |
| ○ Gefrierschrank (-20°C) | Bosch, Gerlingen |
| ○ Gefrierschrank (-80°C) | Heraeus, Hanau |
| ○ Homogenisator Ultra Turrax | Roche, Mannheim |
| ○ iCycler iQ Real-Time PCR Detection System | Biorad, Hercules |
| ○ Kühlschrank (+4°C) | Bosch, Gerlingen |
| ○ Kühlzentrifuge MicroRapid/K | Hettich, Kirchleugern |
| ○ Mikropipetten (0-10µl; 10-100µl; 20-1000µl) | Eppendorf, Hamburg |
| ○ Mikropipetten (100-1000µl) | Eppendorf, Hamburg |
| ○ Mikrowelle | Bosch, Gerlingen |
| ○ Mischgerät: Vortex Genie 2 | Scientific Ind., New York |
| ○ Temperaturzyklusautomat UNO II | Biometra, Goettingen |
| ○ Tischzentrifuge 5415 C | Eppendorf, Hamburg |
| ○ Waage 440-33 | Kern, Ballingen-Frommern |

3.10. Plastik- und Glasmaterial

- Aufbewahrungsrack für PCR-Gefäße neoLab, Heidelberg
- Glasgefäße (250ml; 1000ml) Schott Durau / Roth, Mainz
- MagNA Lyser green Beads Roche, Mannheim
- Messzylinder (100ml) Kartell, Mailand
- Optical Tape iCycler iQ Biorad, Hercules
- PCR-Gefäße (0,2ml) Eppendorf, Hamburg
- PCR-Plates iCycler iQ 96 well (0,2ml) Biorad, Hercules
- Plastikbecher (600ml) vitLab, Seeheim-Jungenhain
- Plastikspitzen für Mikropipetten Eppendorf, Hamburg
- Plastikspitzen für Mikropipetten Biozym, Hamburg
- Reaktionsgefäße (1,5/2,0 ml) Eppendorf, Hamburg

3.11. Chemikalien, Enzyme, Puffer und Lösungen

- Deoxyribonuklease (Dnase I) Roche, Mannheim
- dNTP (2'-deoxynucleoside 5'-triphosphat)-Mix invitrogen, Karlsruhe
- DTT 0,1M invitrogen, Karlsruhe
- Ethanol 99,8% [C₂H₅OH] Merck, Darmstadt
- Ethidiumbromid [C₂₁H₂₀BrN₃] Biorad, Hercules
- First-Strand Puffer
[250mM Tris-HCl; 375 mM KCl; 15mM MgCl₂] invitrogen, Karlsruhe
- Hexanukleotid-Mix
[0.5M Tris-HCl; 0.1M MgCl₂; 1mM Dithioerythrit;
2mg/ml Rinderserumalbumin; Hexanukleotide;
62.5 A₂₆₀ units/ml] Roche, Mannheim
- High Pure RNA Tissue Kit Roche, Mannheim
- Portagerm Pylori BioMerieux, Marcy L'Etoile
- Reverse Transkriptase (SuperScript II) invitrogen, Karlsruhe
- Ribonukleaseinhibitor (RNasin) Promega, Mannheim
- Seakem-GTG Agarose Genetic Tech., St. Louis
- TAE-Puffer
[2M Tris-HCl; 0.05M EDTA; 1M Eisessig]
- Tissue-Tek Miles, Atlantic
- PBS-Puffer
[150mM NaCl; 3mM KCl; 8mM Na₂HPO₄; 2mM KH₂PO₄]
- Weight Marker XIII (50 Basenpaaren) Roche, Mannheim
- Ladungspuffer (10x Blue luice) invitrogen, Karlsruhe

3.12. Oligonukleotid-Sequenzen¹

| mRNA-Target | Oligonukleotid-Sequenz | Produktgröße (bp) |
|---------------------------------|---|-------------------|
| ○ GAPDH | S ² : 5' GAAGGTGAAGGTCGGAGTC 3' A ³ : 5' GAAGATGGTGATGGGATTTC 3' | 188 |
| ○ IFNγ | S : 5' GCATCCAAAAGAGTGTGGAG 3' A : 5' ATGCTCTTCGACCTCGAAAC 3' | 192 |
| ○ IL-10 | S : 5' AGGCTGAGAACCAAGACCCAGA 3' A : 5' GGGCTGGGTCAGCTATCC 3' | 337 |
| ○ IL-12 | S : 5' CTCGTGGCCATATGGGAAC 3' A : 5' TGGCCAGCATCTCCAAACT 3' | 203 |
| ○ CCR4 | S : 5' TGGTTCTGGTCCTGTTCAA 3' A : 5' TATCTATCAATGCTCATGAGCATGA 3' | 175 |
| ○ CXCR3 | S : 5' GGCCTTGAGGTGAGTGACC 3' A : 5' CGAAGTTCAGGCTGAAGTCC 3' | 113 |
| ○ CRTH2 | S : 5' CCAGTTTCAGGGCTAACGAC 3' A : 5' TCAACTTCTAACGACCGAAG 3' | 214 |
| ○ TLR2 | S : 5' TGTCTTGTGACCGCAATGGTA 3' A : 5' GCTTGAACCAGGAAGACGAT 3' | 242 |
| ○ TLR4 | S : 5' GGAGCCCTGCGTGGAGA 3' A : 5' TATGCCCCATCTTCAATTGTC 3' | 299 |

¹ hergestellt von Firma TibMolbiol² Sense (=Forward)³ Antisense (=Reverse)

Beim Design der verwendeten Primer wurden folgende Voraussetzungen beachtet:

- Länge 18-25 Nukleotide
- Primer mit mehr als 3- bis 4-facher Abfolge einer Base (=“Base-Runs“) sind zu vermeiden
- Base G oder C möglichst am 3'-Ende
- Der G/C-Gehalt sollte zwischen 40 und 60% liegen
- Keine Hairpin-loops (komplementäre Rückfaltung)
- 3' und 5' Primer dürfen zueinander keine komplementären Sequenzabschnitte aufweisen

4. Ergebnisse

4.1. Gruppenübersicht

39 Patienten (A1-A39) im Alter von sechs Monaten bis 16 Jahren wurden für die Arbeit ausgewählt und nach den vorher festgelegten Kriterien in 3 Gruppen eingeteilt (Abb. 7).

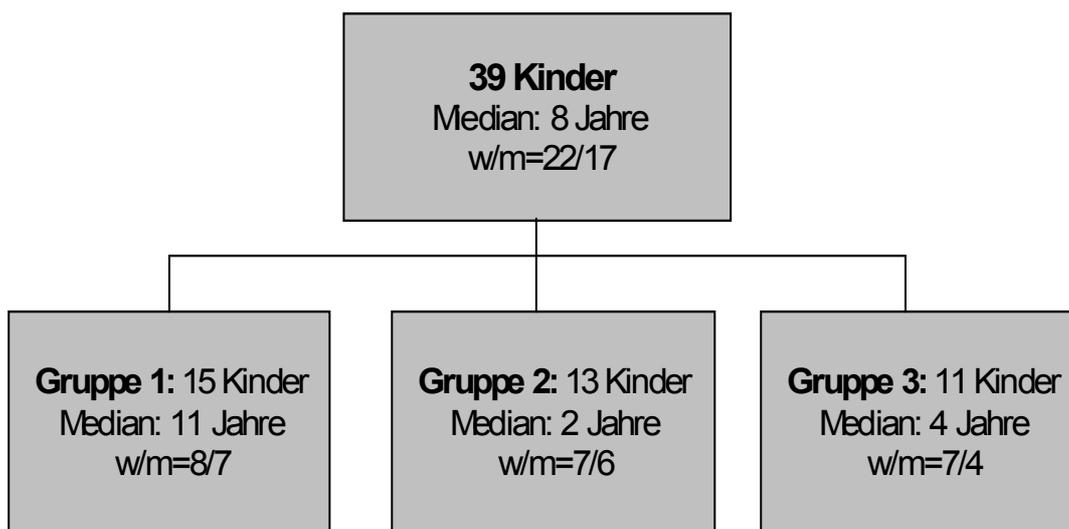


Abb. 7: Gruppenübersicht aller Patienten

4.1.1. Patientengruppe 1

Bei 15 der insgesamt 39 Kinder konnte anhand der definierten Statuskriterien eine *Helicobacter pylori*-Infektion diagnostiziert werden (Tab.2). Bei den betroffenen acht Mädchen und sieben Jungen lag der Altersmedian mit 11 Jahren deutlich über dem der Patientengruppen 2 und 3. Die der Patientengruppe 1 zugehörigen Kinder waren türkischer (n=6), deutscher (n=4), bosnischer (n=1), afghanischer (n=2), albanischer (n=1) und marokkanischer (n=1) Herkunft.

| ID | Geschlecht | Alter | H | Diagnose | bisherige Therapie | Kultur | Atemtest | Histologie & HUT |
|-----|------------|-------|----|------------------|--------------------|--------|----------|------------------|
| A1 | M | 12 | T | <i>H. pylori</i> | Nein | + | + | + |
| A2 | W | 10 | T | <i>H. pylori</i> | Nein | + | + | + |
| A3 | M | 4 | D | <i>H. pylori</i> | Nein | + | + | + |
| A4 | W | 13 | D | <i>H. pylori</i> | Nein | + | + | + |
| A5 | W | 11 | B | <i>H. pylori</i> | Nein | + | + | + |
| A6 | M | 14 | Af | <i>H. pylori</i> | Nein | + | + | + |
| A7 | W | 8 | Al | <i>H. pylori</i> | Nein | + | + | + |
| A8 | M | 9 | T | <i>H. pylori</i> | Nein | + | + | + |
| A9 | M | 11 | M | <i>H. pylori</i> | Nein | + | + | + |
| A10 | M | 15 | T | <i>H. pylori</i> | Nein | - | + | + |
| A11 | M | 11 | T | <i>H. pylori</i> | Nein | + | + | + |
| A12 | W | 8 | T | <i>H. pylori</i> | Nein | + | + | + |
| A13 | W | 16 | D | <i>H. pylori</i> | Nein | + | + | + |
| A14 | W | 10 | Af | <i>H. pylori</i> | Nein | + | + | + / HUT- |
| A15 | W | 6 | D | <i>H. pylori</i> | Nein | + | + | + |

Tab. 2: Diagnostische Befunde bei „*Helicobacter pylori*-Patientengruppe 1“, **Legende:** H=Herkunft Af=Afghanistan; Al=Albanien; B=Bosnien; D=Deutschland; M=Marokko; T=Türkei

Zusätzlich wurde in den Magenbiopsien von neun der 15 Patienten eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) durchgeführt, die jeweils den Nachweis von *Helicobacter pylori* erbrachte. Alle Kinder (A1-A15) klagten beim Arztbesuch über chronisch-rezidivierende nahrungsunabhängige oder -abhängige Bauchschmerzen. Drei Kinder (A1; A4; A6) gaben darüber hinaus Übelkeit und postprandiales Erbrechen an, wovon zwei (A4; A6) zudem an Gewichtsverlust von bis zu 6kg litten. Die Patienten A8 und A10 erwähnten bei der ärztlichen Anamnese ein retrosternales Brennen. Bei A1 konnte eine atopische Dermatitis diagnostiziert werden. Nebenbefundlich konnte in der ÖGD bei zwei Kindern (A4; A5) eine axiale Gleithernie festgestellt werden. Bei keinem der Kinder wurde zuvor eine *Helicobacter pylori*-Infektion nachgewiesen und keines der Kinder hatte zu einem früheren Zeitpunkt eine Eradikationstherapie erhalten. Hinsichtlich der Familienanamnese war eine *Helicobacter pylori*-Infektion weder bei Eltern, noch bei Geschwistern der Patienten zu eruieren. In *Tabelle 3* ist die Sydney-Klassifikation der Patientengruppe 1 dargestellt. Alle histologischen Präparate wurden geblindet von einem Pathologen des Pathologischen Institutes der LMU München nachbefundet.

| Patienten | Aktivität | Chronizität | <i>Hp</i> -Dichte | Metaplasie | Atrophie |
|-----------|-----------|-------------|-------------------|------------|----------|
| A1 | + | ++ | ++ | - | - |
| A2 | ++ | ++ | ++ | - | + |
| A3 | ++ | ++ | +++ | - | + |
| A4 | ++ | ++ | ++ | - | + |
| A5 | ++ | ++ | +++ | - | + |
| A6 | ++ | ++ | ++ | - | + |
| A7 | ++ | ++ | ++ | - | + |
| A8 | ++ | ++ | ++ | - | + |
| A9 | + | ++ | ++ | - | - |
| A10 | + | ++ | ++ | - | - |
| A11 | ++ | ++ | ++ | - | - |
| A12 | +++ | ++ | +++ | - | + |
| A13 | + | + | + | + | + |
| A14 | ++ | ++ | ++ | - | - |
| A15 | ++ | ++ | ++ | - | - |

Tab. 3: Sydney-Klassifikation der Patientengruppe 1 (Antrumproben)

Die meisten Kinder der Patientengruppe 1 zeigten hinsichtlich der Chronizität im Antrum eine Grad 2-Gastritis (Tab.4).

| Graduierung | Grad 0 (-) | Grad 1 (+) | Grad 2 (++) | Grad 3 (+++) |
|-----------------------------|------------|------------|-------------|--------------|
| Patientengruppe 1 (n=15) | 0 0% | 1 6,7% | 14 93,3% | 0 0% |

Tab. 4: Chronizitätsgrad der Patienten A1-A15

Bei allen Patienten zeigte sich im Sinne einer chronischen Gastritis eine Lymphozyten- und Plasmazellinfiltration in der lamina propria mit Bildung von Lymphfollikeln bei den Kindern A3, A5, A9 und A15. A13 wies eine intestinale Metaplasie auf.

4.1.2. Patientengruppe 2

13 Kinder (w/m=7/6; Altersmedian: 2 Jahre) wurden der Gruppe 2 zugeteilt, welche als *Helicobacter pylori*-negative magengesunde Kontrollgruppe definiert ist (Tab.5). Bei allen Kindern waren die diagnostischen Nachweisverfahren wie ¹³C-Harnstoff-Atemtest, histologischer Nachweis (Sydney-Klassifikation), mikrobiologische Kultivierung und Urease-Schnelltest hinsichtlich des *Helicobacter pylori*-Status negativ. Mit einem Altersmedian von zwei Jahren war dies die jüngste Patientengruppe.

| ID | Geschlecht | Alter | Endoskop. Diagnose | Therapie | Kultur | Atemtest | Histologie & HUT |
|-----|------------|-------|--------------------|------------------------|--------|----------|------------------|
| A16 | M | 1 | Normal | Nein | - | - | - |
| A17 | W | 2 | GÖR | Nein | - | - | - |
| A18 | M | 2 | GÖR | Omeprazol ⁴ | - | - | - |
| A19 | W | 15 | GÖR | Nein | - | - | - |
| A20 | W | 7 | Normal | Nein | - | - | - |
| A21 | M | 0.5 | GÖR | Nein | - | - | - |
| A22 | W | 1 | Normal | Nein | - | - | - |
| A23 | W | 15 | GÖR | Nein | - | - | - |
| A24 | W | 16 | GÖR | Nein | - | - | - |
| A25 | M | 2 | GÖR | Omeprazol ⁴ | - | - | - |
| A26 | M | 8 | GÖR | Nein | - | - | - |
| A27 | M | 2 | GÖR | Nein | - | - | - |
| A28 | W | 13 | GÖR | Nein | - | - | - |

Tab. 5: Befunde bei Patienten mit „Normalbefund“ und „Gastroösophagealem Reflux“

⁴ Einnahme des Protonenpumpeninhibitors (PPI) bis vier Wochen vor Probeentnahme

| Patienten | Aktivität | Chronizität | <i>Hp</i> -Dichte | Metaplasie | Atrophie |
|-----------|-----------|-------------|-------------------|------------|----------|
| A16 | - | + | - | - | - |
| A17 | - | + | - | - | + |
| A18 | - | + | - | - | - |
| A19 | - | + | - | - | + |
| A20 | - | + | - | - | - |
| A21 | - | ++ | - | - | + |
| A22 | - | - | - | - | + |
| A23 | - | + | - | - | + |
| A24 | - | + | - | - | - |
| A25 | - | + | - | - | - |
| A26 | - | ++ | - | - | ++ |
| A27 | - | + | - | - | - |
| A28 | - | + | - | - | + |

Tab. 6: Sydney-Klassifikation der Patientengruppe 2 (Antrumproben)

Einige Patienten litten unter mehreren Beschwerden. 32% der Kinder (n=6) klagten über Bauchschmerzen, 28% (n=5) berichteten von Übelkeit und Erbrechen, 17% klagten über Sodbrennen und Gewichtsverlust. Ein Patient gab Durchfall an. Bei drei Kindern (A19; A21; A28) wurde eine atopische Diathese festgestellt. Diese Patienten litten unter einer allergischen Rhinitis oder einer atopischen Dermatitis. Eine Nahrungsmittelallergie war bei ihnen nicht bekannt. Keines der Patienten litt zu einem früheren Zeitpunkt an einer *Helicobacter pylori*-Infektion, auch war in der Familie keine Infektion anamnestisch bekannt. Bei 10 Kindern (A17-A19; A21; A23-A28) bestand eine Refluxösophagitis. Bei A16, A20 und A22 ergab die ÖGD einen Normalbefund. Histologisch zeigten alle Proben nach der Sydney-Klassifikation keine Infiltration mit Granulozyten, das heißt keine aktive Gastritis. Zwei Patienten hatten eine mäßige, die übrigen eine leichte Lymphozyteninfiltration (Grad 1), was noch einem Normalbefund entspricht. Erwartungsgemäß fand sich kein Bakteriennachweis und keine Metaplasie. (Tab.6). Bei 7 Patienten konnte eine gering- (A18; A20; A22-24; A29) bis mittelgradige (A27) Atrophie nachgewiesen werden. Endoskopisch wurde bei vier Kindern (A18; A21; A24; A28) eine axiale Gleithernie festgestellt.

4.1.3. Patientengruppe 3

11 (w/m=7/4) der 39 Kinder wurden der Gruppe 3 zugeteilt, die als *Helicobacter pylori*-negative „disease control“ fungiert (Tab.7). Bei den Patienten A29-A39 konnte histologisch im Duodenum und serologisch (spezif. Ak gg. Gewebs-transglutaminase oder Endomysium) eine Zöliakie (ZÖL) diagnostiziert werden.

| ID | Geschlecht | Alter | Diagnose | Therapie | <i>H. pylori</i> -Status | Antikörper-Status | Histologie ⁵ |
|-----|------------|-------|----------|----------|--------------------------|-------------------|-------------------------|
| A29 | W | 1 | Zöliakie | Nein | - | + | + |
| A30 | W | 2 | Zöliakie | Nein | - | + | + |
| A31 | W | 4 | Zöliakie | Nein | - | + | + |
| A32 | M | 3 | Zöliakie | Nein | - | + | + |
| A33 | M | 14 | Zöliakie | Nein | - | + | + |
| A34 | W | 4 | Zöliakie | Nein | - | + | + |
| A35 | M | 3 | Zöliakie | Nein | - | + | + |
| A36 | W | 5 | Zöliakie | Nein | - | + | + |
| A37 | W | 11 | Zöliakie | Nein | - | + | + |
| A38 | M | 10 | Zöliakie | Nein | - | + | + |
| A39 | W | 8 | Zöliakie | Nein | - | + | + |

Tab. 7: Diagnostische Befunde bei Patientengruppe 3 mit „Zöliakie“

⁵Marsh-Klassifikation (Marsh 1: normale Zotten und Krypten, vermehrte intraepitheliale Lymphozyten; Marsh 2: normale Zotten, Kryptenhyperplasie, Entzündung der lamina propria; Marsh 3: zunehmende Entzündung, zunehmende Zottenatrophie, Kryptenhyperplasie; Marsh 4: Zotten- und Kryptenhypoplasie)

Nach der Sydney-Klassifikation zeigte sich bei allen Kindern eine nicht-aktive Antrumgastritis ohne Nachweis von *Helicobacter pylori* und ohne Hinweis auf eine Metaplasie (Tab.8). Drei Patienten (A30; A33; A36) zeigten eine Schleimhautatrophie. Aufgrund folgender Symptome wurde das Kinderspital aufgesucht: Bauchschmerzen (A29; A34; A35; A36), Übelkeit/Erbrechen (A38), Meteorismus (A34; A36; A37), Durchfall (A30; A33; A36), übelriechender Stuhl (A37), Appetitlosigkeit (A29; A31; A36), Infektanfälligkeit (A33), Müdigkeit (A31; A39), Gewichtsverlust (A39) und Gedeihstörungen (A31; A35). Bei A29, A30, A34 wurde eine Eisenmangelanämie, bei A39 ein Typ-1-Diabetes diagnostiziert. Bei A31 war eine positive Familienanamnese für die Zöliakie bekannt.

| Patienten | Aktivität | Chronizität | <i>Hp</i> -Dichte | Metaplasie | Atrophie |
|-----------|-----------|-------------|-------------------|------------|----------|
| A29 | - | + | - | - | - |
| A30 | - | ++ | - | - | + |
| A31 | - | + | - | - | - |
| A32 | - | + | - | - | - |
| A33 | - | + | - | - | + |
| A34 | - | + | - | - | - |
| A35 | - | + | - | - | - |
| A36 | - | + | - | - | + |
| A37 | - | + | - | - | - |
| A38 | - | + | - | - | - |
| A39 | - | + | - | - | - |

Tab. 8: Sydney-Klassifikation der Patientengruppe 3 (Antrumproben)

4.2. Inter-Assay Variabilität

Für unsere Analyse wurden folgende Zytokine und Chemokinrezeptoren untersucht, von welchen wir eine immunregulatorische Beteiligung an den durch *Helicobacter pylori* verursachten Gewebsschäden annahmen: IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, CCR4, CCR5, CXCR3, CRTH2, TLR2 und TLR4. Folgende Zytokine und Chemokinrezeptoren wurden aufgrund nicht messbarer, zu geringer mRNA-Expression in der Real-Time-PCR oder aufgetretener DNA-Verunreinigungen aus der Auswertung ausgeschlossen: CCR5, IL-4, IL-5, IL-8 und IL-13. Um das Verhalten der mRNA-Expression jedes einzelnen Patienten (A1-A39) der verbleibenden Rezeptoren und Zytokinen in Abhängigkeit der unterschiedlichen Amplifikationsläufe beurteilen zu können, wurden die erhobenen Expressionsdaten der einzelnen Th1-/Th2-Moleküle im Verlauf verglichen. Bei einer Inter-Assay Variabilität von über 20% wurden die Patienten in den Expressionsanalysen nicht weiter berücksichtigt. Bei CXCR3 musste Patient A33 ausgeschlossen werden. Bei IFN- γ konnten A6-A10, sowie A19, A21, A29, A30 und A34 nicht berücksichtigt werden. Bei IL-12 wurden A35 und A38 ausgeschlossen. Aufgrund einer Variabilität von über 20 % konnte bei CCR4 A4, A19-A20, A23 und A29 nicht in die Expressionsanalysen einbezogen werden. Bei CRTH2 musste A37, bei IL-10 A19, A30-A34 und A39 ausgeschlossen werden. Bei TLR2 wurden A1, A5, A6, A8, A17, A23, A31, A32, A36 und A39 nicht berücksichtigt. Bei TLR4 mussten A1, A4, A5, A8, A16, A22, A30, A31, A35, A36 und A39 aus den Analysen ausgeschlossen werden.

4.3. mRNA-Expressions-Analyse

In den folgenden Gliederungspunkten werden die Expressionsdaten der verwendeten Th1-/Th2-Moleküle im Einzelnen sowohl für *Helicobacter pylori*-positive (Patientengruppe 1), als auch *Helicobacter pylori*-negative Patienten (Patientengruppe 2 und 3) dargestellt. In die statistische Berechnung fließt ein Mittelwert ein, der sich aus zwei verschiedenen PCR-Amplifikationsläufen mit messbarer Expression zusammensetzt. Aus der Expressionsanalyse wurden diejenigen Patienten ausgeschlossen, bei denen in der Gelelektrophorese eine DNA-Verunreinigung nachweisbar war und die Inter-Assay Variabilität eine Abweichung von über 20% aufwies.

4.3.1. Th1-Moleküle

4.3.1.1. CXCR3

CXCR3 wird zu den inflammatorischen Chemokinrezeptoren gerechnet und gilt als Vertreter einer Th1-vermittelten Immunantwort [169;170]. Bei der Analyse von CXCR3 im Magengewebe zeigte sich bei der Patientengruppe 2 mit einem Median von 0,80 der höchste Expressionswert (*Tab.9*).

| Patienten | Median CXCR3/GAPDH |
|--------------------|------------------------|
| Gruppe 1 (A1-A15) | 0,66 (0,00-0,85); n=15 |
| Gruppe 2 (A16-A28) | 0,80 (0,00-0,87); n=9 |
| Gruppe 3 (A29-A39) | 0,76 (0,69-0,81); n=10 |

Tab. 9: CXCR3-Expression im Patientenvergleich

Im Vergleich der Patientengruppen zeigten die Kontrollgruppen signifikant höhere Expressionswerte (*Abb.8*).

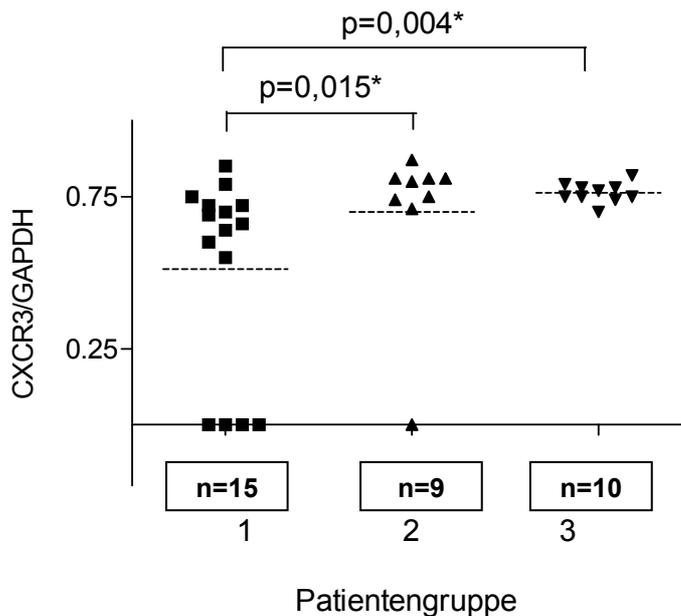


Abb. 8: CXCR3-Expression der Patientengruppen 1-3. p =Signifikanzniveau nach *Mann-Whitney-U-Test*; signifikanter Unterschied mit * markiert

Von insgesamt 15 Kindern der **Patientengruppe 1** wurden alle Patienten statistisch ausgewertet. Bei Patient A1, A4, A5 und A8 war in allen PCR-Läufen kein CXCR3-Amplifikationsprodukt im Antrum nachweisbar. Bei den übrigen Kindern A2, A3, A6, A7, A9-A15 konnten zwei PCR-Messungen verwertet werden. Dabei zeigten 73,3% der eingeschlossenen Patienten einen positiven Expressionswert, 26,7% wiesen mit einem Null-Wert keine Expression auf. In der **Patientengruppe 2** konnten neun von insgesamt 13 Kindern in die Bewertung einfließen. Bei den Patienten A16-A23 konnte CXCR3 zweimal nachgewiesen werden. Bei Kind A28 war in den Expressionsläufen kein CXCR3-Produkt messbar. Die Patienten A24-A27 mussten aufgrund von DNA-Verunreinigungen aus den Berechnungen ausgeschlossen werden. 88,9% hatten einen positiven Expressionswert, 11,1% der Patienten zeigten einen Null-Wert. In den Magenbiopsien der **Patientengruppe 3** war bei 10 Kindern (A29-A32; A34-A39) ein CXCR3-Produkt zweimal nachweisbar. A33 musste aufgrund einer Inter-Assay Variabilität von über 20% aus der Expressionsanalyse genommen werden. Alle der Patienten hatten eine positive Expression. Insgesamt wurden bei der Auswertung von CXCR3 87,2% der Patienten ($n=34$) in die Analyse eingeschlossen und 12,8% ($n=5$) ausgeschlossen.

4.3.1.2. IFN-gamma

Durch Bindung am sogenannten IFNGR1-Rezeptor erfüllt IFN- γ insbesondere immunregulatorische Aufgaben [7]. Als Vertreter der Th1-Zytokinfamilie ist IFN- γ an der Pathogenese der Th1-dominanten *Helicobacter pylori*-Infektion beteiligt und reguliert die Entzündungsaktivität in der infizierten Magenschleimhaut. Bei der Analyse von IFN- γ im Magengewebe zeigte sich bei der Patientengruppe 1 mit einem Median von 0,62 der höchste Expressionswert (Tab. 10).

| Patienten | Median IFN-gamma/GAPDH |
|--------------------|------------------------|
| Gruppe 1 (A1-A15) | 0,62 (0,00-0,67); n=10 |
| Gruppe 2 (A16-A28) | 0,00 (0,00-0,73); n=11 |
| Gruppe 3 (A29-A39) | 0,00 (0,00-0,78); n=8 |

Tab. 10: IFN- γ -Expression im Patientenvergleich

Zwischen den *Helicobacter pylori*-positiven Kindern und der Patientengruppe 2 und 3 konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 9).

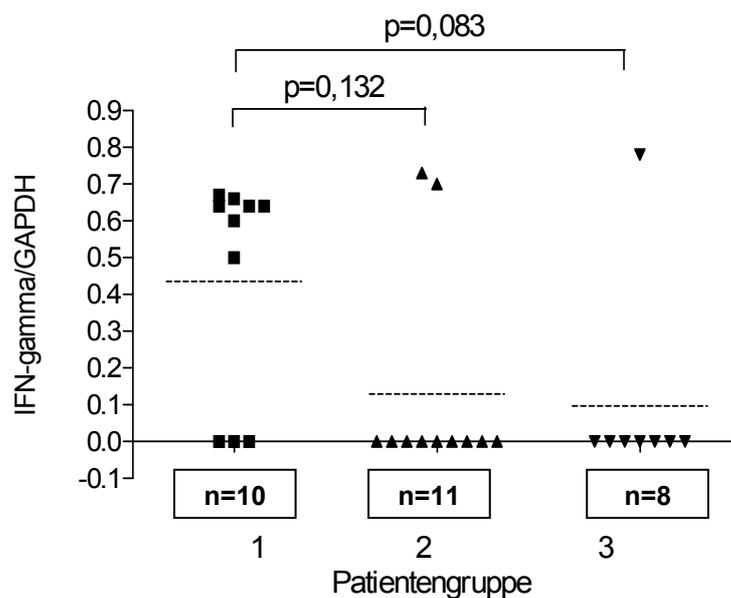


Abb. 9: IFN- γ -Expression der Patientengruppen 1-3. p=Signifikanzniveau nach *Mann-Whitney-U-Test*, signifikanter Unterschied mit * markiert

Von insgesamt 15 Patienten der **Patientengruppe 1** konnten 10 Kinder in die statistische Auswertung genommen werden. In den Magenbiopsien der Patienten A1, A4 und A5 konnte in beiden Expressionsläufen kein Amplifikationsprodukt von IFN- γ nachgewiesen werden.

Im Antrum von sieben (A2; A3; A11-A15) der verbliebenen Kindern war IFN- γ bei negativen Kontrollen in beiden Untersuchungen nachweisbar. 70% der Patienten wiesen einen positiven Expressionswert auf. Bei 30% lag in der Expressionsanalyse ein Null-Wert vor. In der Analyse der **Patientengruppen 2 und 3** konnte IFN- γ bei den Patienten A18, A22 und A31 zweimal nachgewiesen werden. Bei den Kindern A6-A10, A19, A21, A29, A30 und A34 wurde eine Inter-Assay Variabilität von über 20% festgestellt, wodurch diese Patienten nicht für die Expressionsanalyse verwertet werden konnten. Bei den GÖR-Kindern zeigten 81,8% einen Null-Wert (18,2% mit positiver Expression), bei den Zöliakie-Patienten hatten hinsichtlich der Expression 87,5% einen Null-Wert (12,5% mit positiver Expression). Insgesamt wurden bei der Auswertung von IFN- γ 74,3% der Patienten (n=29) in die Expressionsanalyse eingeschlossen und 25,7% (n=10) ausgeschlossen.

4.3.1.3. IL-12

Als Gegenspieler von IL-10, induziert IL-12 die T-Zell-unabhängige IFN- γ Produktion und sorgt für eine Th1-Zell-Differenzierung. Durch die Aktivierung des Transkriptionsproteins STAT4 soll IL-12 an der Immunantwort gegen Bakterien und somit auch bei der *Helicobacter pylori*-Infektion beteiligt sein [15;74]. Bei der Analyse von IL-12 im Magengewebe zeigte sich bei der Patientengruppe 1 mit einem Median von 0,63 der höchste Expressionswert (Tab. 11).

| Patienten | Median IL-12/GAPDH |
|--------------------|------------------------|
| Gruppe 1 (A1-A15) | 0,63 (0,00-0,87); n=15 |
| Gruppe 2 (A16-A28) | 0,00 (0,00-0,00); n=13 |
| Gruppe 3 (A29-A39) | 0,00 (0,00-0,00); n=9 |

Tab. 11: IL-12-Expression im Patientenvergleich

Zwischen den *Helicobacter pylori*-positiven Kindern und der Patientengruppe 2, sowie der „disease control“ konnte ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 10).

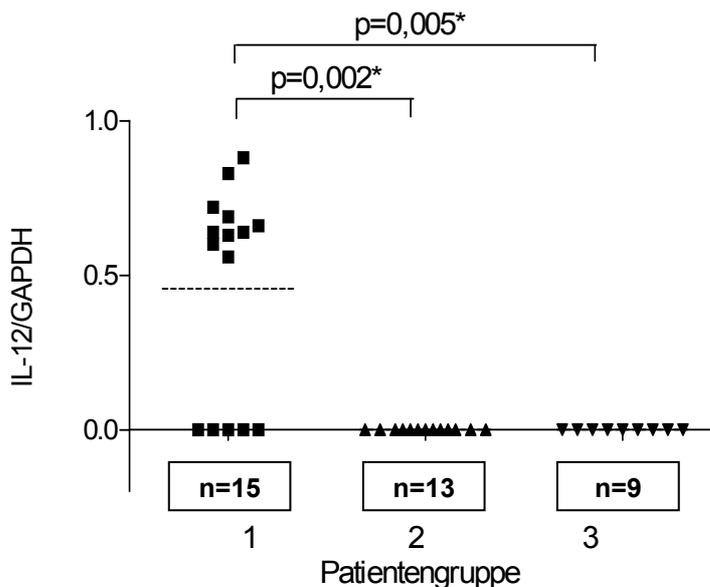


Abb. 10: IL-12-Expression der Patientengruppen 1-3. p=Signifikanzniveau nach *Mann-Whitney-U-Test*; signifikanter Unterschied mit * markiert

Von insgesamt 15 Kindern der **Patientengruppe 1** wurden alle statistisch ausgewertet. Bei den Patienten A1, A5, A6, A8 und A9 konnte in den durchgeführten PCR-Läufen kein Amplifikationsprodukt nachgewiesen werden. Bei den verbliebenen 10 Kindern wurde ein IL-12-Produkt bei A2, A3, A4, A7 und A10-A15 zweimal gemessen. 66,6% der Patienten hatten einen positiven Expressionswert. In den Magenbiopsien der **Patientengruppe 2** war bei allen Kindern (A16-A23) kein IL-12-Expressionsprodukt bei negativer Kontrolle nachweisbar. 100% der Kinder wiesen in der Expressionsanalyse einen Null-Wert auf. Auch bei der Analyse der **Patientengruppe 3** gelang in 100% der Fälle kein Expressionsnachweis (A29-A34; A36-A37 und A39). Die Kinder A35 und A38 mussten aufgrund einer Inter-Assay Variabilität von über 20% aus der Expressionsanalyse genommen werden. Insgesamt wurden bei der Auswertung von IL-12 94,9% der Patienten (n=37) in die Bewertung eingeschlossen und 5,1% (n=2) ausgeschlossen.

4.3.2. Th2-Moleküle

4.3.2.1. CCR4

CCR4 wird hauptsächlich von aktivierten Th2-Zellen exprimiert und sorgt vor allem für eine antigen-vermittelte T- und B-Zell-Interaktion [196]. Bei der Analyse von CCR4 im Magengewebe zeigte sich bei der Patientengruppe 1 mit einem Median von 0,76 der höchste Expressionswert (Tab. 12).

| Patienten | Median CCR4/GAPDH |
|--------------------|------------------------|
| Gruppe 1 (A1-A15) | 0,76 (0,00-0,85); n=14 |
| Gruppe 2 (A16-A28) | 0,00 (0,00-0,74); n=7 |
| Gruppe 3 (A29-A39) | 0,36 (0,00-0,77); n=10 |

Tab. 12: CCR4-Expression im Patientenvergleich

Zwischen den *Helicobacter pylori*-infizierten Kindern und der magengesunden Kontrollgruppe konnte ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 11).

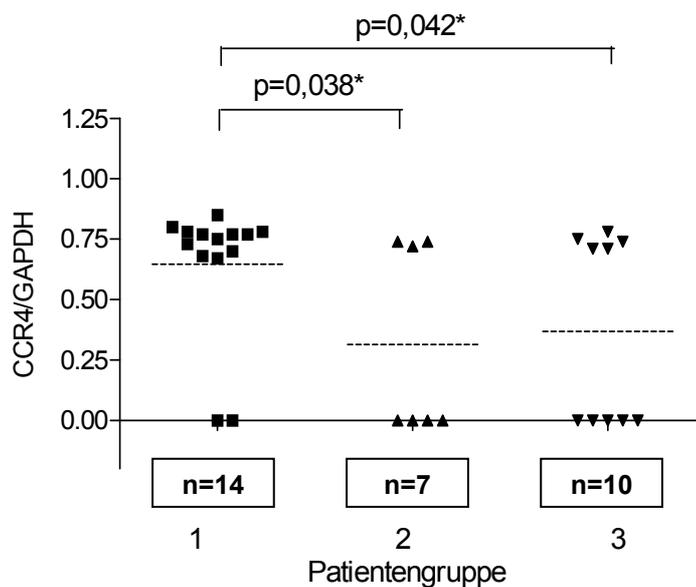


Abb. 11: CCR4-Expression der Patientengruppen 1-3. p=Signifikanzniveau nach *Mann-Whitney-U-Test*, signifikanter Unterschied mit * markiert

Von insgesamt 15 Patienten der **Patientengruppe 1** konnten 14 Kinder in die statistische Auswertung genommen werden. Bei Patient A1 und A8 war in beiden PCR-Läufen kein CCR4-Amplifikationsprodukt nachweisbar. Im Antrum der übrigen Patienten A2, A3, A5-A7 und A9-A15 wurde CCR4 zweimal nachgewiesen. In 85,7% der Fälle wurde eine positive Expression nachgewiesen. In der **Patientengruppe 2** konnten sieben von insgesamt 13 Kindern in die Analyse einfließen. Bei A17, A22, A25 und A28 war CCR4 in beiden PCR-Läufen bei negativer Kontrolle nicht nachweisbar. Im Antrum der übrigen Patienten A16, A18 und A21 wurde CCR4 zweimal nachgewiesen. Die Patienten A24, A26 und A27 konnten aufgrund von Doppelbanden in der Gelelektrophorese nicht berücksichtigt werden. Bei 57,1% der Kinder zeigte sich ein positiver Expressionswert. Im **Patientenkollektiv 3** war bei fünf (A32; A33; A36-A38) der elf Kinder kein CCR4-Expressionsprodukt zu messen. Bei A30, A31, A34, A35 und A39 konnte CCR4 in beiden PCR-Läufen nachgewiesen werden. Die Kinder A4, A19, A20, A23 und A29 mussten aufgrund einer Inter-Assay Variabilität von über 20% aus der Expressionsanalyse genommen werden. 50% der Kinder hatten einen positiven Expressionswert, 50% einen Null-Wert. Insgesamt wurden bei der Auswertung von CCR4 79,5% der Patienten (n=31) in die Analyse eingeschlossen und 20,5% (n=8) ausgeschlossen.

4.3.2.2. CRTH2

CRTH2 wird auf Th2-Zellen exprimiert. Es scheint eine Rolle bei der Entwicklung des atopischen Ekzems zu spielen [35]. Eine mögliche Beteiligung von CRTH2 an der Pathogenese der *Helicobacter pylori*-Infektion sollte anhand der Expression dieses Moleküls untersucht werden. Dabei hatte die Patientengruppe 2 mit einem Median von 0,80 den höchsten Expressionswert (*Tab. 13*).

| Patienten | Median CRTH2/GAPDH |
|---------------------------|------------------------------|
| Gruppe 1 (A1-A15) | 0,71 (0,66-0,90); n=7 |
| Gruppe 2 (A16-A28) | 0,80 (0,74-0,86); n=8 |
| Gruppe 3 (A29-A39) | 0,77 (0,73-0,87); n=5 |

Tab. 13: CRTH2-Expression im Patientenvergleich

Zwischen den Patientengruppen 1, 2 und 3 konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (*Abb. 12*).

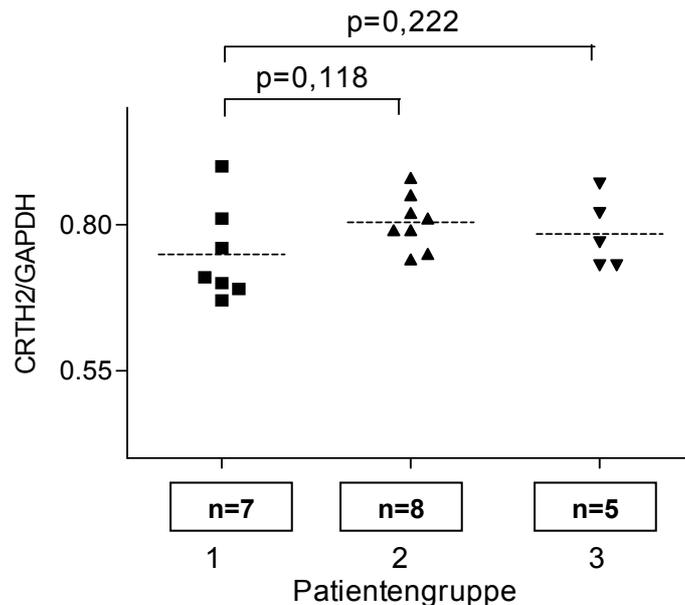


Abb. 12: CRTH2-Expression der Patientengruppen 1-3. p =Signifikanzniveau nach *Mann-Whitney-U-Test*; signifikanter Unterschied mit * markiert

Von insgesamt 15 Patienten der **Patientengruppe 1** konnten sieben Kinder in die statistische Auswertung des CRTH2-Rezeptors genommen werden. Die restlichen acht Patienten A1-A8 mussten aufgrund von Doppelbanden in der Gelelektrophorese ausgeschlossen werden. In den Magenbiopsien der verbliebenen sieben Patienten A9–A15 konnte CRTH2 jeweils zweimal nachgewiesen werden. 100% der verwerteten Patienten zeigten einen positiven Expressionswert. Bei der Bewertung der **Studiengruppe 2** konnte CRTH2 bei acht (A16-A23) von 13 Kindern sowohl im ersten, wie auch im zweiten Expressionslauf gemessen werden. Fünf Patienten (A24-A28) wurden aufgrund nachweisbarer DNA-Verunreinigungen aus der Bewertung genommen. 100% der Kinder hatten einen positiven Expressionswert. Im Antrum der 11 Kinder umfassenden **Patientengruppe 3** wurde CRTH2 bei A29, A30, A31, A33 und A34 zweimal gemessen. Die Kinder A35-A39 konnten statistisch nicht bewertet werden, da in der Gelelektrophorese der einzelnen Biopsate DNA-Verunreinigungen feststellbar waren. 100% der untersuchten Biopsien zeigten einen positiven Expressionswert. A32 konnte aufgrund einer Inter-Assay Variabilität von über 20% nicht für die Expressionsanalyse verwertet werden.

4.3.3. IL-10

Das Zytokin IL-10 sorgt vor allem für eine Unterdrückung Th1-vermittelter Immunantworten. Da IL-10 zur verminderten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine führt, wird es auch als „Cytokine synthesis inhibitory factor“ bezeichnet [60]. Dabei hemmt es insbesondere die IFN- γ Synthese. Hinsichtlich der Th1-dominanten *Helicobacter pylori*-Infektion wird IL-10 in der Magenschleimhaut vermehrt exprimiert und sorgt somit für eine Unterdrückung der Th-1 induzierten Entzündungsreaktion [84]. Eine Beteiligung von IL-10 an der Pathogenese *Helicobacter pylori*-infizierter Kinder im Vergleich zu nicht-infizierten Kindern soll anhand dieser Analyse untersucht werden. Bei der Patientengruppe 1 zeigte sich mit einem Median von 0,64 der höchste Expressionswert (Tab. 14).

| Patienten | Median IL-10/GAPDH |
|--------------------|-------------------------------|
| Gruppe 1 (A1-A15) | 0,64 (0,00-0,83); n=15 |
| Gruppe 2 (A16-A28) | 0,30 (0,00-0,81); n=12 |
| Gruppe 3 (A29-A39) | 0,00 (0,00-0,00); n=5 |

Tab. 14: IL-10-Expression im Patientenvergleich

Zwischen den *Helicobacter pylori*-positiven Kindern und der Patientengruppe 3 konnte mit einem p-Wert von 0,007 ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 13).

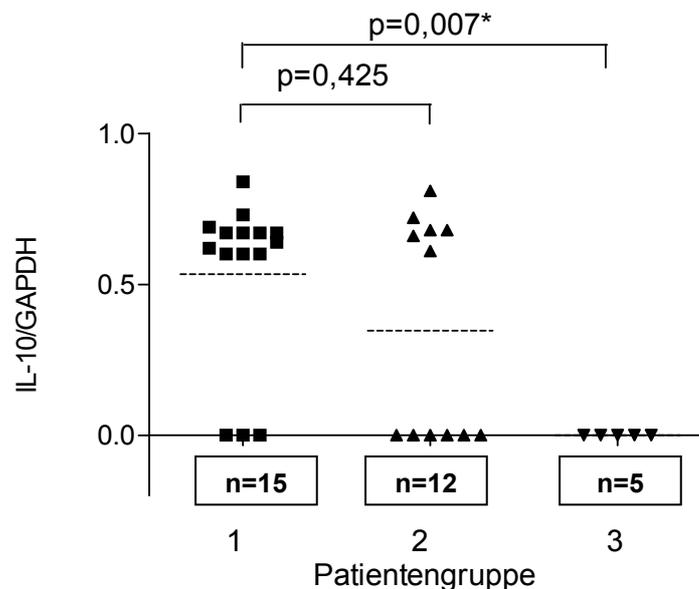


Abb. 13: IL-10-Expression der Patientengruppen 1-3. p=Signifikanzniveau nach *Mann-Whitney-U-Test*, signifikanter Unterschied mit * markiert

Von insgesamt 15 Patienten der **Patientengruppe 1** konnten alle Kinder (A1-A15) in die statistische Auswertung genommen werden. A1, A8 und A9 waren die einzigen Kinder, bei denen ein IL-10-Amplifikationsprodukt in beiden durchgeführten PCR-Läufen nicht nachweisbar war. Bei 12 (A2-A7; A10-A15) der 15 *Helicobacter pylori* infizierten Kindern konnte eine IL-10-Expression zweimal gemessen werden. 80% der Patienten hatten einen positiven Expressionswert. Innerhalb der „magengesunden“ **Patientengruppe 2** konnte ein IL-10-Produkt bei 6 (A16; A24-A28) der 13 Patienten sowohl im ersten, wie auch im zweiten Expressionslauf bei negativer Kontrolle nicht detektiert werden. Im Antrum von sechs (A17; A18; A20; A21-A23) der verbliebenen sieben Patienten war IL-10 zweimal messbar. 50% der verwendeten Biospien zeigten hinsichtlich ihres Expressionswertes einen Null-Wert. Bei der **Patientengruppe 3** hatten fünf (A29; A35; A36; A37 und A38) der 11 Kinder keine nachweisbare Expressionswerte. Bei A19, A30-A34 und A39 wurde eine Inter-Assay Variabilität von über 20% festgestellt, wodurch diese Patienten nicht für die Expressionsanalyse verwertet werden konnten. 100% der Kinder hatten einen Null-Wert in ihrer Expression. Insgesamt wurden bei der Auswertung von IL-10 82% der Patienten (n=32) in die Analyse eingeschlossen und 18% (n=7) ausgeschlossen.

4.3.4. TLR2 und TLR4

TLR2 und TLR4 zählen zur Gruppe der Toll-like-Rezeptoren, welche bei der Pathogenerkennung eine entscheidende Rolle spielen und durch ihre Fähigkeit fremdartige Molekularmuster (PAMPs) zu erkennen eine gerichtete Zytokinproduktion hauptsächlich gegen Bakterien aufbauen [3]. TLR2 organisiert dabei die Abwehr gegen gram-positive Keime [202]. TLR4 wird insbesondere durch Lipopolysaccharide gram-negativer Bakterien stimuliert [27]. Beide Rezeptortypen scheinen eine Th1-dominante Immunantwort auszulösen. Um eine Beteiligung dieser beiden Rezeptoren bei der *Helicobacter pylori*-Infektion ermitteln zu können, wiesen wir die mRNA von TLR2 und TLR4 im Magengewebe erkrankter Kinder nach und verglichen diese mit der Expression *Helicobacter pylori*-negativer Patienten. Bei der Analyse von TLR2 und TLR4 zeigte sich bei der Patientengruppe 1 mit einem Median von 0,61 (TLR2) und 0,67 (TLR4) der höchste Expressionswert (Tab. 15).

| Patienten | Median TLR2/GAPDH | Median TLR4/GAPDH |
|--------------------|------------------------|------------------------|
| Gruppe 1 (A1-A15) | 0,61 (0,00-0,72); n=4 | 0,67 (0,62-0,77); n=11 |
| Gruppe 2 (A16-A28) | 0,00 (0,00-0,73); n=10 | 0,00 (0,00-0,73); n=9 |
| Gruppe 3 (A29-A39) | 0,00 (0,00-0,72); n=7 | 0,00 (0,00-0,73); n=6 |

Tab. 15: TLR2- und TLR4-Expression im Patientenvergleich

Bei TLR4 konnte zwischen den *Helicobacter pylori*-infizierten Kindern und der „disease control“ ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 14-15).

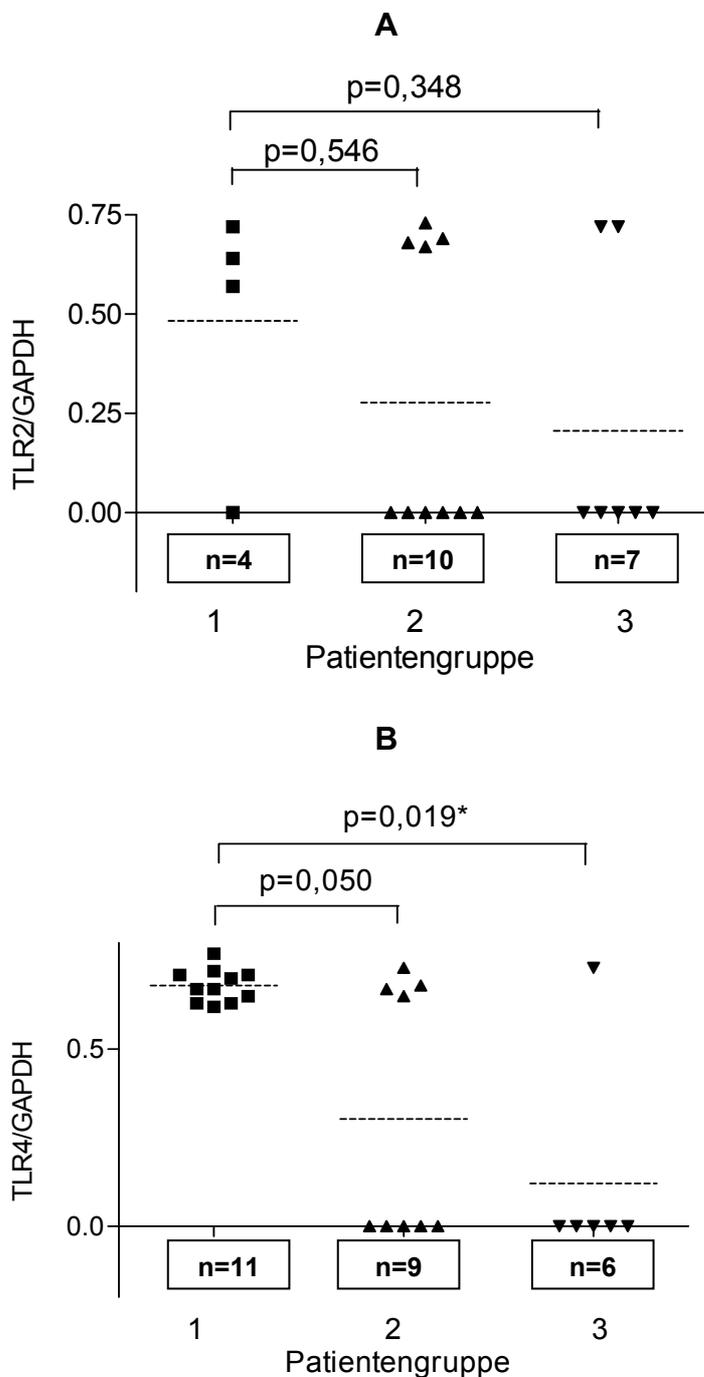


Abb. 14-15: TLR2-(A) und TLR4-Expression (B) der Patientengruppen 1-3. p =Signifikanzniveau nach *Mann-Whitney-U-Test*; signifikanter Unterschied mit * markiert

Bei TLR2 (A) wurden von 15 Kindern der **Gruppe 1** vier statistisch ausgewertet. In den Magenbiopsien von A2, A3 und A7 wurde TLR2 in beiden Versuchsansätzen exprimiert. Bei A4 war in den PCR-Läufen kein TLR2-Amplifikationsprodukt nachweisbar. Die Patienten A9-A15 mussten aufgrund von DNA-Verunreinigungen aus den Berechnungen ausgeschlossen werden. 75% der verwerteten Biopsien zeigten einen positiven Expressionswert. Vom **Patientenkollektiv 2** flossen zehn Kinder von 13 in die Analyse ein, wovon bei A16, A18, A21 und A22 TLR2 zweimal gemessen werden konnte. Bei sechs (A19; A20; A24; A25; A27; A28) dieser zehn Patienten war in zwei PCR-Läufen keine TLR2-Expression nachweisbar. Patient A26 musste aufgrund von Doppelbanden in der Gelelektrophorese ausgeschlossen werden. 60% der Patienten hatten in der Expressionsanalyse aller verwendeten Biopsien einen Null-Wert. Bei fünf (A29; A33; A35; A37; A38) der elf Kinder aus **Gruppe 3** konnte ein TLR2-Produkt sowohl im ersten, wie auch im zweiten Expressionslauf nicht detektiert werden. Im Antrum der übrigen sechs Kinder wurde TLR2 bei A30 und A34 zweimal gemessen. 57,1% der eingeschlossenen Kinder wiesen hinsichtlich der Expression einen Null-Wert auf. Bei den restlichen Patienten A31, A32, A36 und A39 konnte wie bei A1, A5, A6, A8, A17 und A23 eine Inter-Assay Variabilität von über 20% festgestellt werden, so dass diese nicht für die Expressionsanalyse zur Verfügung standen. Bei TLR4 (B) wurde bei elf der 15 Kindern der **Gruppe 1** TLR4 im ersten, wie auch im zweiten Lauf nachgewiesen. Somit zeigten 100% der Biopsien einen positiven Expressionswert. Bei der Analyse der **Patientengruppe 2** konnten neun der 13 Kinder berücksichtigt werden. Die Patienten A26 und A27 wurden aufgrund nachweisbarer DNA-Verunreinigung ausgeschlossen. Bei fünf (A19; A20; A24; A25 und A28) der 13 Kinder konnte in den durchgeführten PCR-Läufen kein Amplifikationsprodukt nachgewiesen werden. In den Biopsien von A17, A18, A21 und A23 war TLR4 zweimal messbar. 55,5% der Kinder zeigten bei einem Null-Wert keine Expression. Bei A29, A32, A33, A37 und A38 der 11 Kinder aus **Gruppe 3** konnte TLR4 in beiden Läufen nicht nachgewiesen werden. Im Antrum der übrigen sechs Patienten konnte TLR4 bei Kind A34 zweimal detektiert werden. 100% der Patienten hatten bei der Expressionsanalyse einen positiven Wert. A30, A31, A35, A36 und A39 konnten wie A1, A4, A5, A8, A16 und A22 aufgrund einer Inter-Assay Variabilität von über 20% nicht für die Expressionsanalyse verwertet werden.

4.4. Korrelation der molekularbiologischen Marker untereinander

Als nächstes sollte überprüft werden, ob zwischen den gemessenen Molekülen ein Zusammenhang innerhalb der *Helicobacter pylori*-positiven Patienten besteht. Die signifikanten Zusammenhänge sind in der *Tabelle 16* sowie in den *Abbildungen 16-18* dargestellt.

| Moleküle | CXCR3 (n=15) | CCR4 (n=14) | IFN- γ (n=10) |
|-------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|
| TLR4 (n=11) | $r=0,732$; $p=0,010^*$ | $r=0,757$; $p=0,007^*$ | $r=0,729$; $p=0,063$ |

Tab. 16: Korrelation von TLR4 zu CXCR3, CCR4 und IFN- γ (Spearman-rho); signifikante Korrelation mit * markiert

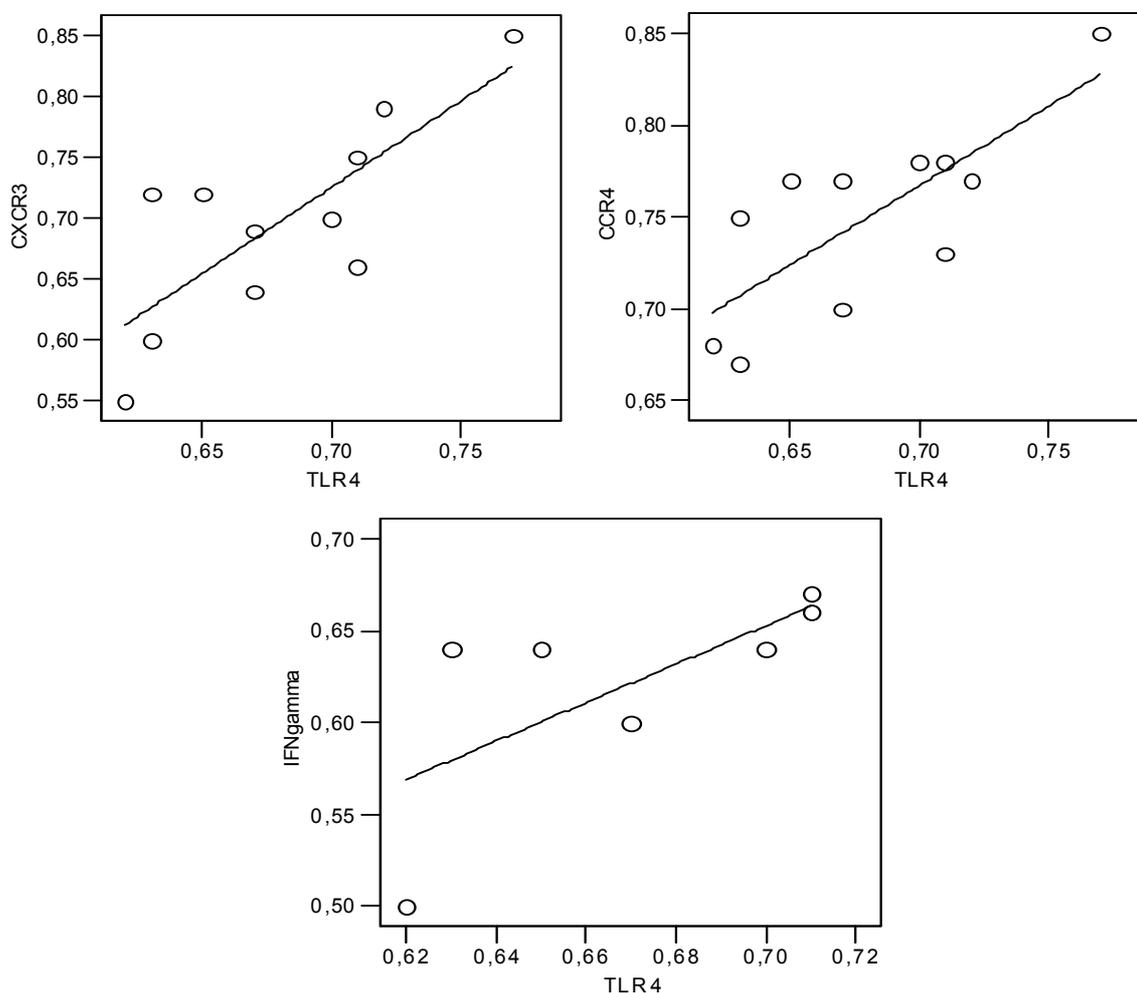


Abb. 16-18: Zusammenhang zwischen TLR4, CXCR3, CCR4 und IFN- γ nach Spearman-rho

4.5. Korrelation zwischen Expression und der Sydney-Klassifikation sowie zwischen Expression und Alter der Patienten

Weiter sollte überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen der gemessenen Expression der jeweiligen Moleküle und der Sydney-Klassifikation sowie zwischen der Expression und dem Alter der Patienten besteht. Bei der Betrachtung der einzelnen Moleküle und der Sydney-Klassifikation konnte zwischen Expression und Aktivität, Chronizität sowie der *Hp*-Dichte keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Korrelationen zwischen Expression und Alter der Patienten zeigte sich in der Betrachtung der Patientengruppen 1, 2 und 3 lediglich für die Moleküle CCR4 in der „disease control“-Gruppe 3 ($p=0,44^*$; $r= -0,644$), sowie für TLR2 in den Patientengruppen 1 ($p=0,00^*$; $r= -1,000$) und 2 ($p=0,26^*$; $r= -0,728$) signifikante Zusammenhänge des Alters zur Expression. Für die übrigen Moleküle konnten für die einzelnen Gruppen keine signifikanten Korrelationen nachgewiesen werden (Tab. 17-19).

| Patientengruppe 1 | CCR4 | CXCR3 | TLR2 | TLR4 | CRTH2 | IFN- γ | IL-10 | IL-12 |
|-----------------------------|-------|-------|--------|-------|-------|---------------|-------|--------|
| Korrelationskoeffizient (r) | 0,183 | 0,098 | -1,000 | 0,376 | 0,664 | -0,481 | 0,162 | -0,097 |
| Signifikanz (p) | 0,532 | 0,728 | 0,000* | 0,255 | 0,104 | 0,159 | 0,563 | 0,730 |

Tab. 17: Korrelation der Expression mit Alter der Patienten (Gruppe 1); signifikante Korrelation nach Spearman-rho mit * markiert

| Patientengruppe 2 | CCR4 | CXCR3 | TLR2 | TLR4 | CRTH2 | IFN- γ | IL-10 | IL-12 |
|-----------------------------|--------|-------|--------|--------|-------|---------------|--------|-------|
| Korrelationskoeffizient (r) | -0,420 | 0,398 | -0,728 | -0,213 | 0,722 | -0,477 | -0,018 | - |
| Signifikanz (p) | 0,407 | 0,329 | 0,026* | 0,613 | 0,067 | 0,138 | 0,958 | - |

Tab. 18: Korrelation der Expression mit Alter der Patienten (Gruppe 2); signifikante Korrelation nach Spearman-rho mit * markiert

| Patientengruppe 3 | CCR4 | CXCR3 | TLR2 | TLR4 | CRTH2 | IFN- γ | IL-10 | IL-12 |
|-----------------------------|--------|-------|--------|--------|-------|---------------|-------|-------|
| Korrelationskoeffizient (r) | -0,644 | 0,093 | -0,316 | -0,131 | 0,553 | -0,249 | - | - |
| Signifikanz (p) | 0,044* | 0,799 | 0,490 | 0,805 | 0,334 | 0,552 | - | - |

Tab. 19: Korrelation der Expression mit Alter der Patienten (Gruppe 3); signifikante Korrelation nach Spearman-rho mit * markiert

5. Diskussion

1. Probanden

1.1. Charakteristika der *Helicobacter pylori*-infizierten Patienten

15 der insgesamt 39 Kinder wurden der Studiengruppe 1 zugeteilt, welche sich ausschließlich aus *Helicobacter pylori*-infizierten Patienten zusammensetzt. Dabei wurde die Diagnose einer *Helicobacter pylori*-Infektion nach den in Kapitel 3.1. beschriebenen Statuskriterien gestellt. Die hierfür verwendeten Testverfahren ¹³C-Harnstoff-Atemtest, Histologie, Urease-Schnelltest (HUT) und Kultur sind klinische Standardverfahren und bereiteten keine diagnostischen Schwierigkeiten [100]. Lediglich Patient A10 wies, trotz positivem Atemtest, positivem histologischen Nachweis von *Helicobacter pylori* und positivem HUT einen negativen Befund in der kulturellen Anzucht auf. Da alle anderen Diagnoseverfahren positive Ergebnisse lieferten, ist anzunehmen, dass bei diesem Kind ein falsch negatives Kulturergebnis vorlag, zumal die Anzucht von *Helicobacter pylori* aufgrund seiner hohen Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff und warmen Temperaturen sehr schwierig ist. *Rüssmann et al.* [167] beschrieben für die kulturelle Anzucht des gram-negativen Keimes in einer 2001 erschienenen Studie, trotz hoher Spezifität von 100%, lediglich eine Sensitivität von 82,7%. Dabei ist zu erwähnen, dass trotz neuer nicht-invasiver Testverfahren, wie dem monoklonalen Stuhl-Antigen-Test, die ÖGD inklusive der Entnahme von Biopsien nach wie vor der Goldstandard der Diagnosestellung einer *Helicobacter pylori*-Infektion bei Kindern ist [51;67]. Deshalb wurde bei der Auswahl der Patienten für die Gruppe 1 (A1-A15) darauf geachtet, dass diese einen positiven *Helicobacter pylori* Nachweis in der Magenbiopsie aufwiesen. Bei 15 von 15 Patienten der Gruppe 1 konnte in der histologischen Begutachtung der Biopsien *Helicobacter pylori* mikroskopisch nachgewiesen werden. Der *Hp*-Status der in die Arbeit eingeschlossenen Kinder darf somit als eindeutig gewertet werden. Bei der weiteren Betrachtung der Sydney-Klassifikation wurde histologisch lediglich in der Patientengruppe 1 eine aktive Antrumgastritis festgestellt. Die Kinder der Gruppe 2 zeigten bei fehlendem *Hp*-Nachweis keine aktive Gastritis im Magenantrum und zeigten, bis auf drei Kinder nur eine leichte Lymphozyteninfiltration, die als normal gewertet wird. Damit bestätigte sich bei diesen Kindern die klinische Einteilung „magengesund“.

Die Bedeutung der Nationalität bei der *Helicobacter pylori*-Infektion ist unbestritten. Lediglich 26,6% aller Kinder (n=4) der Patientengruppe 1 waren deutscher Herkunft. Die Prävalenz der *Helicobacter pylori*-Infektion bei türkischen Kindern in Deutschland liegt zum Zeitpunkt der Einschulung bei etwa 45%, während deutsche Kinder in nur 6,1% infiziert sind. *Rothenbacher et al.* [164] wiesen in einer aktuellen Studie nach, dass die Prävalenz türkischer Kinder in Deutschland rückgängig ist. Eine Aussage hinsichtlich der Auswirkungen der Herkunft und des Zytokinmusters lassen sich anhand unserer Arbeit aufgrund zu geringer Fallzahlen nicht machen. Ein unterschiedliches Zytokinmuster aufgrund unterschiedlicher Nationalität ist bisher in der Literatur nicht beschrieben, vielmehr zeigt sich eine Abhängigkeit des Krankheitsverlaufes von den Virulenzfaktoren CagA und VacA, welche in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt wurden [204]. Das Verhältnis von immunologischem Expressionsmuster und Virulenzfaktoren könnte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

Endoskopisch zeigen *Helicobacter pylori*-infizierte Kinder im Vergleich zu Erwachsenen eine Besonderheit, die als sogenannte Nodularität bezeichnet wird. Diese Schleimhautveränderungen des Magens gehören neben erythematösen Veränderungen und Erosionen zu den makroskopischen Hauptmerkmalen einer durch *Helicobacter pylori*-verursachten Antrumgastritis. Auch bei unseren Patienten wurden bei 14 von 15 Kindern noduläre Schleimhautveränderungen endoskopisch nachgewiesen. Laut *Uhlig et al.* [200] ist diese Nodularität des Kindes als wichtiges Zeichen einer hoch-aktiven Gastritis zu deuten. Andere Untersuchungen hingegen zeigten, dass die nodulären Schleimhautveränderungen nur gering mit dem Grad der Entzündungsaktivität assoziiert sind [55]. In der vorliegenden Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen Nodularität und chronischer Entzündungsaktivität nicht untersucht werden. Dazu mangelte es für einen aussagekräftigen Vergleich an infizierten Kindern ohne Nodularität.

5.1.2. Patientengruppe 2 und 3

Diese beiden Studiengruppen dienten mit insgesamt 24 Kindern als Kontrollgruppen. In der Beurteilung beider Patientengruppen nach der Sydney-Klassifikation war bei allen Kindern der Gruppen 1 und 2 kein *Helicobacter pylori* nachweisbar. Ebenso konnte bei den Patienten A16-A39 eine aktive Antrumgastritis ausgeschlossen werden. Der histologische Nachweis einer geringen Infiltration mit mononukleären Zellen im Magenantrum kann in dieser mäßigen Ausprägung auch bei gesunden Personen vorkommen. Da eine lymphozytäre Gastritis auch im Rahmen einer Zöliakie-Erkrankung auftritt, diente in unseren immunologischen Analysen die Patientengruppe 3 bei gleichzeitiger *Hp*-Negativität und histologischem Nachweis der Marsh-Kriterien als Vergleichsgruppe zu den *Hp*-positiven Kindern. Überraschend war der Befund einer Magenatrophie, nicht nur bei den *Hp*-infizierten Kindern, sondern mit gleicher Häufigkeit bei den Kontrollkindern der Gruppen 2 und 3. Für die Beschreibung der „Atrophie“ besteht laut Zimaity et al. [216] eine große interobserver Variabilität hinsichtlich des Vorhandenseins oder der Abwesenheit einer Schleimhautatrophie. Als mögliche Ursache hierfür werden technische Präparationsprobleme der Probiopsien wie beispielsweise Schnittführung, Schnittdicke und Orientierung der Biopsie diskutiert. So wurde in verschiedenen pädiatrischen Arbeiten die Häufigkeit der Atrophie von 0%–72% bei *Hp*-Infizierten und von 0%–22% bei *Hp*-negativen Kindern beschrieben. Angesichts dieser Kontroverse in der Literatur sollten die Befunde bezüglich Atrophie bei unseren Patienten nicht überbewertet werden. Obwohl die Kinder der Gruppe 2 symptomatisch waren und Beschwerden wie beispielsweise Bauchschmerzen und Sodbrennen angaben, ergab die durchgeführte endoskopische Diagnostik keinen Hinweis auf eine Mitbeteiligung des Magens. Als endoskopische Diagnosen konnten bei diesen 13 Kindern eine Gastro-ösophageale Refluxkrankheit (n=10) und Normalbefunde (n=3) erhoben werden. Da sich die Magenschleimhaut nach einer *Helicobacter pylori*-Infektion nur langsam regeneriert, wurden Kinder nach durchgeführter Eradikation nicht in diese Patientengruppe aufgenommen. Allerdings standen zwei Kinder (A18; A25) bis vier Wochen vor Entnahme der Probiopsien unter einer säuresuppressiven Therapie mit Omeprazol. Omeprazol bindet irreversibel an die H⁺/K⁺-ATPase und führt durch verstärkte Synthese von Glukoproteinen zu einem zytoprotektiven Effekt.

Vier bis fünf Tage nach Einnahme verliert das Medikament seine Wirkung auf die Magenschleimhaut, so dass nach vier Wochen kein Einfluß des Protonenpumpeninhibitors mehr anzunehmen ist. Bei A19, A21 und A28 wurde eine atopische Diathese in Form einer allergischen Rhinitis und eines atopischen Ekzems ohne Manifestation einer Lebensmittelallergie diagnostiziert, so dass ein Einfluß auf die Magenschleimhaut unwahrscheinlich ist.

Der Gruppe 3 wurden diejenigen Patienten zugeteilt, bei denen nach der Marsh-Klassifikation eine Zöliakie diagnostiziert werden konnte. Die Zöliakie ist eine genetisch determinierte Th1-vermittelte Immunerkrankung, welche insbesondere durch eine vermehrte Produktion von TNF- α und IFN- γ einhergeht. Dadurch kommt es zu einer Zellinfiltration der Schleimhaut, zur Apoptose und zur Entstehung des charakteristischen histologischen Bildes einer Zottenatrophie und Kryptenhyperplasie insbesondere des Dünndarms. Im Rahmen dieser immunologischen Grunderkrankung kann es auch zu einer Magenbeteiligung mit einer lymphozytären Gastritis kommen [46]. Bei allen Kindern (n= 11) unserer Vergleichsgruppe war eine chronisch lymphozytäre Antrumgastritis zu erkennen. Diese *Hp*-negative chronische Gastritis der Zöliakie-Kinder, erlaubt die spezifische Immunantwort einer *Helicobacter pylori*-induzierten Antrumgastritis im Vergleich der Zytokinmuster besser zu charakterisieren.

Diese Einteilung der Kinder in Gruppe 2 und 3 erfolgte, um die mRNA-Expression der *Helicobacter pylori*-positiven und -negativen Patienten besser charakterisieren zu können. Dieser Vergleich der infizierten Kinder mit magengesunden und einer „disease control“, ist in vergleichbaren Studien bei Kindern und Erwachsenen unberücksichtigt geblieben. Meist wird zwischen infizierten und gesunden Patienten unterschieden [75;112;181;211]. Durch Untersuchung einer solchen *Hp*-negativen, aber kranken Kontrollgruppe, lässt sich die spezifische Th1-/Th2-Expressionsanalyse besser differenzieren und beurteilen.

5.1.3. Bedeutung der Gruppengröße

Eine Patientenanzahl von insgesamt 39 Kindern stellt eine eher geringe Fallzahl dar, so dass bei den Ergebnissen der mRNA Expressionsanalyse der molekularbiologischen Marker keine Normalverteilung anzunehmen war. Für die statistischen Auswertungen bedeutete dies, dass ausschließlich nicht-parametrische Testverfahren angewandt werden mussten. Im Vergleich zu anderen Studien, die das Expressionsmuster von Zytokinen, Chemokinen und Chemokinrezeptoren bei *Helicobacter pylori*-infizierten Magengewebe analysierten, wurden meist größere Fallzahlen an Studienpatienten untersucht. Diesbezüglich handelte es sich allerdings größtenteils um Untersuchungen an Erwachsenen unter Verwendung unterschiedlicher Methoden [8;20;24;75;84;98;112;180;181]. Um eine möglichst „saubere“ Population an Patienten zu erhalten, mussten viele Proben aufgrund der in Kapitel 3.1. formulierten Vorgaben ausgeschlossen werden.

5.2. Molekularbiologische Methoden

5.2.1. RNA-Extraktion

Bustin SA beschrieb, dass verschiedene Methoden der Gewebepreparation zu unterschiedlichen Resultaten der RNA-Ausbeute führen [26]. Um die RNA der verschiedenen Biopsien der Patienten A1-A39 möglichst einheitlich zu isolieren, verwendeten wir das standardisierte Extraktionsprotokoll „RNA Tissue Kit“ von Roche. Die Ausbeute an RNA ist abhängig vom Ausgangsmaterial und variiert in Abhängigkeit von der jeweiligen Gewebearart. Anhand verschiedener Gewebetypen, welche aus einer Maus gewonnen wurden, zeigte sich bei gleicher Gewebemenge und Verarbeitung eine unterschiedliche RNA-Ausbeute (Leber 0,5-2,8µg/mg; Lunge 0,3-0,5µg/mg). Dass auch die Art und Weise mit der das Gewebe gewonnen wird Einfluß auf die RNA-Ausbeute hat, ist in Studien bewiesen worden. Im Vergleich von lasergesteuerten, mikrodisssezierten und mittels einer Biopsie gewonnen Gewebeprobe, herrschen im Expressionsprofil laut *Sugiyama et al.* [194] signifikante Unterschiede. Diese Tatsache ist hinsichtlich unserer Analysen, bei der die Patientenproben endoskopisch gewonnen wurden, zu berücksichtigen.

Andererseits ist die Gewinnung von *Helicobacter pylori*-infiziertem Gewebe *in vivo* nur durch endoskopische Intervention und Biopsie möglich. Hinsichtlich des cDNA-Gewinnes ist von *Swift et al.* [195] festgestellt worden, dass die Ausbeute von Sequenzen nahe des 5'-Endes partiell degradierter mRNA signifikant geringer ausfällt. Deshalb sei es laut *Sugita et al.* [193] notwendig, Assays zu entwickeln, die degradierte RNA identifizieren können. Diese Tatsachen bestätigen unser Vorgehen, mit einem standardisierten Extraktionsprotokoll gearbeitet zu haben. Umso mehr, da die RNA der Proben der Gruppen 1-3 zu unterschiedlichen Zeitpunkten isoliert wurde. Um außerdem DNA-Verunreinigungen, welche die exakte Quantifizierung beeinträchtigen, zu verhindern, wurde die isolierte RNA mit einem enzymatischen DNase-Verdau aufgereinigt. Problematisch ist dabei, dass es bei geringen Mengen an Ausgangsmaterial zu RNA-Verlusten kommen kann. Um die extrahierte RNA nach der Isolation und dem DNase-Verdau weiter verwerten zu können, ist es wichtig, dass sich keine DNase-Reste in den Proben befinden. Diese Notwendigkeit der DNase-freien RNA wurde in unserem Protokoll durch mehrere Waschschriffe gewährleistet.

5.2.2. Reverse-Transkription

Die Reverse-Transkription ist äußerst wichtig für die Sensitivität und Genauigkeit der Quantifikation. Die Menge an cDNA, welche von der Reversen-Transkriptase produziert wird, sollte in etwa der Menge an eingesetzter RNA entsprechen. Für ein positives Ergebnis ist die Qualität der Transkriptase entscheidend. Den konventionellen Enzymen stehen Transkriptasen der neuen Generation, wie Sensiscript (Qiagen®) und Superscript II (GibcoBRL®/Invitrogen®) gegenüber. Diesen wird eine höhere RNA-Affinität und eine genauere RnaseH-Funktion zugeschrieben. Für unsere cDNA-Synthese verwendeten wir das sogenannte Superscript II von Invitrogen®. Vergleichsstudien zeigten, dass zwischen Superscript II und Sensiscript bei einem RNA-Äquivalent von 1.25ng kein Unterschied besteht [26]. Bei geringeren Mengen (0.125ng) des Ausgangsmaterials hingegen, wie bei unseren Proben vermutet, produziert Superscript II etwa fünfmal mehr an cDNA-Template als Sensiscript [26]. Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte im Temperaturzyklusautomat UNO II von Biometra® bei einer Temperatur von 42°C und somit in dem gewöhnlich für die Transkription verwendeten Temperaturspektrum von 40-50°C.

Raja et al. [156] beschrieben für diese niedrigen Temperaturen und insbesondere bei geringem Ausgangsmaterial eine Unspezifität der Reversen-Transkription. Nicht-spezifische Nebenreaktionen können die gewünschte Umschreibung stören und zu einem frühzeitigen Ende der Produktamplifikation führen. So beschrieben *Malboeuf et al.* [118], dass auch G/C-reiche mRNA die Transkription bei einer Temperatur von 40-50°C behindert, indem es zu einem Enzymstopp führt und eine Dissoziation der Transkriptase von der RNA verursacht. Aus diesem Grund setzten wir das thermostabile Enzym Superscript II ein, welches seine Aktivität bis 70°C behält und somit Spezifität und Effizienz erhöht. Zur Qualitätskontrolle der cDNA-Synthese wurden neben den Reverse Transkriptase(RT)-positiven, auch RT-negative Proben zubereitet. An Stelle von Superscript II wurde dem Reaktionsgemisch aqua ad iniectabilia hinzugegeben. Dadurch soll eine Reverse Transkription der Matrize ausbleiben und eine Kontamination der cDNA mit genomischer DNA kontrolliert werden. Die Umschreibung der RNA in cDNA bleibt aus, so dass bei der späteren spezifischen PCR kein Produkt entsteht. Erscheint dennoch ein PCR-Produkt, so beweist das die Kontamination mit genomischer DNA.

2.3. Real-Time RT-PCR und Quantifikation

Obwohl die Real-Time RT-PCR dafür bisher nur selten verwendet worden ist, ist diese Methode für eine schnelle und reproduzierbare Messung von Zytokinen geeignet [80;157;190;212]. Allerdings ist, wie schon bei der konventionellen PCR, auch bei der Real-Time RT-PCR die Reproduzierbarkeit der gemessenen mRNA-Expression ein Problem. Um diesbezüglich hinsichtlich unserer Analysen eine Aussage treffen zu können, bewerteten wir die Stabilität der gemessenen Werte anhand der Darstellung der Inter-Assay Variabilität. Dabei verwendeten wir als Ausgangsdaten das Verhältnis der C_t -Werte von Zielmolekül/GAPDH.

Die in der Literatur angegebene niedrige Intra- und Inter-Assay Variabilität mit hoher Reproduzierbarkeit bei der Verwendung von Sonden und SYBRGreen, konnte in unseren Experimenten für alle Patienten bestätigt werden [148;212]. Bei allen verwendeten Th1- und Th2-Molekülen konnte mit Ausnahme von TLR2 eine Inter-Assay-Variabilität mit signifikanter Korrelation zwischen den beiden PCR-Läufen nachgewiesen werden.

Trotz standardisierter Protokolle sieht *Bustin SA* [26] in der relativen Ungenauigkeit der manuellen Arbeit, die Quelle der auch in der vorliegenden Arbeit vorgekommenen Datenvariation. Bei einem Vergleich von drei Forschern zeigten sich bei gleichen Ausgangssubstanzen und -mengen hinsichtlich der endgültig detektierten Kopienzahl/ μg RNA mit Werten zwischen $8\cdot 7 \times 10^5$ und $2\cdot 7 \times 10^3$ signifikante Unterschiede [26]. Bezüglich dieser Unterschiede ist auch die Anzahl der einzelnen Arbeitsschritte von der Isolation bis zur Amplifikation zu berücksichtigen. Je mehr Versuchsschritte, desto höher ist die potentielle Fehlerquote. Darüber hinaus scheint das in unserer Arbeit verwendete SYBR*Green*, im Vergleich zu Sonden, einen Einfluß auf die Variabilität der Werte zu haben. *Yin et al.* [212] zeigten, dass insbesondere bei niedrigem Expressionsniveau, SYBR*Green* eine geringere Reproduzierbarkeit aufweist. Da innerhalb der Ausgangsproben für die PCR in Abhängigkeit des endoskopisch gewonnenen Patientenmaterials eine große Variation herrscht, mussten die Proben mittels einer internen Referenz normiert werden. Als interner Standard wurde das „housekeeping“-Gen GAPDH verwendet, welches als Enzym der Glykolyse ubiquitär in allen Zellen vorkommt und eine konstante Expression aufweist [54;208]. Dennoch wird die Verwendung von GAPDH als interne Referenz kontrovers diskutiert. Im Gegensatz zu den oben erwähnten Literaturstellen konnten *Bustin et al.* [25] und *Tricarico et al.* [199] nachweisen, dass die GAPDH mRNA von ein und demselben Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten ein unterschiedliches Expressionsverhalten aufweist. Das Verhalten von GAPDH ist auch abhängig von der Art des Gewebes, aus welchem das Probenmaterial gewonnen wird. Dabei zeigt GAPDH im gesunden Magengewebe im Vergleich zu 18S-rRNA eine deutlich geringere Kopienzahl/ng [76]. Auch die GAPDH-Kopienzahl zwischen verschiedenen Gewebearten zeigt große Schwankungen. In Muskel- und Milzgewebe sind zwischen 200-800 Kopienzahlen/ng messbar, im Magen, der Leber und Prostata hingegen nur bis zu 100/ng. Hinsichtlich der Quantifikation im Rahmen der Real-Time RT-PCR bleibt GAPDH dennoch, trotz der erwähnten Probleme, der am häufigsten verwendete Normierungsfaktor. Zur Quantifizierung ist ferner die Bestimmung des sogenannten Schwellenwertes von großer Bedeutung. Der Schwellenwert ist als der Wert definiert, an dem das Fluoreszenzniveau signifikant über dem Fluoreszenz-Hintergrundslevel liegt.

Bei der Definition dieses Schwellenwertes stehen dem Benutzer des iCycler zwei Verfahren zur Verfügung: die automatische und die benutzer-definierte Festlegung der „PCR-Base-Line“, welche wir verwendeten. Dabei kann ein Fluoreszenzniveau festgelegt werden, bei dem sich alle Proben in der exponentiellen Phase der Amplifikation befinden und eine identische Fluoreszenzintensität aufweisen. Diese Methode erlaubt die Quantifizierung von Proben kleiner 1000 Kopienzahlen. Bei der quantitativen PCR ist weiterhin die Ausgangszahl der zu amplifizierenden Moleküle zu berücksichtigen. Eine exponentielle Vervielfältigung der zu amplifizierenden Moleküle kann innerhalb von 20 Zyklen bei etwa 3000-50.000 Startmolekülen, innerhalb von 25 Zyklen bei 200-3000 Matrizen und innerhalb von 30 Zyklen bei 10-400 Startmolekülen erwartet werden [95].

Die mRNA-Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten eine auffällige Verteilung: für die einzelnen Zytokine waren die mRNA-Expressionsniveaus meist in etwa gleicher Höhe oder gar nicht nachweisbar. Hierfür kommen einerseits methodische, andererseits klinische Ursachen in Frage. Zunächst lag wenig Ausgangsmaterial vor, da bei den Kindern nur jeweils eine Biopsie für die Analysen entnommen werden konnte. Zum Teil waren diese Biopsien sehr klein. Weiter wurden die Zellen in den Biopsien, anders als z.B. bei Arbeiten in der Gewebekultur [14], nicht zusätzlich stimuliert, um die *in vivo*-Situation möglichst genau abzubilden. Deshalb ist davon auszugehen, dass die Kopienzahl der einzelnen Zytokine in den Biopsien sehr niedrig ist. Es kann daher sein, dass die Kopienzahl gerade ausreicht, um überhaupt ein Amplifikat zu erhalten. Weiter ist es möglich, dass die An- oder Abschaltung der Zytokinsynthese in der Magenschleimhaut im Sinne einer Ja/Nein-Antwort erfolgt.

5.2.4. Gelelektrophorese

In unseren Versuchen zeigten sich bei einer nicht unerheblichen Anzahl von Proben, trotz DNase-Verdau, Kontaminationen mit genomischer DNA. So mussten am Beispiel des Chemokinrezeptors CCR5 die Patienten A1-A15, A24-A28 und A35-A39 wegen unspezifischer Amplifikate in der Gelelektrophorese aus der Expressionsanalyse ausgeschlossen werden. Durch diese hohe Ausschlussquote blieb dieser Chemokinrezeptor in der endgültigen Interpretation der Ergebnisse unberücksichtigt. Die Besonderheit im Falle CCR5 war, dass diese Kontaminationen bei der Interpretation der Schmelzkurve nicht nachweisbar waren, da CCR5 auf einem einzigen Exon kodiert ist. Somit unterscheidet sich das amplifizierte RNA-Produkt in der Größe nicht von amplifizierter genomischer DNA. Erst die anschließend durchgeführte Gelelektrophorese erbrachte neben dem erwarteten CCR5-Produkt mit einer molekularen Größe von 380bp, den Erweis uncharakteristischer Produktamplifikate mit 300bp.

Auch *Lekanne Deprez et al.* [102] beschreiben dieses Phänomen der Ungenauigkeit von Schmelzkurve und Gelelektrophorese. So beobachtete das Forscherteam eine spezifische „melting peak“ in der PCR, im Gel allerdings mehrere unspezifische Banden. Daher ist trotz der Möglichkeit der Schmelzkurvenanalyse eine Gelelektrophorese zur Überprüfung von Reinheit und Spezifität des Expressionsergebnisses unerlässlich. Aus diesem Grund wurden für unsere Untersuchungen nur diejenigen Patientenproben berücksichtigt, die in der Schmelzkurvenanalyse einen einzelnen spezifischen Schmelzgipfel und in der Gelelektrophorese eine einzelne Bande von erwarteter Größe aufwiesen.

5.3. Ergebnisse

5.3.1. Th1-Moleküle

5.3.1.1. CCR5 und CXCR3

CCR5 und CXCR3, werden bevorzugt auf Th1-Zellen exprimiert und sind gemeinsam mit ihren Liganden IP-10, MIG und I-TAC (CXCR3) sowie RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β (CCR5) als inflammatorische Chemokinrezeptoren an entzündlichen Gewebsreaktionen beteiligt [132;154]. Dabei scheint CCR5 ein mukosa-spezifischer Rezeptor des Gastrointestinaltraktes zu sein [116]. Die Expression von CCR5 und CXCR3 soll andererseits der generelle Phänotyp gewebsinfiltrierender Lymphozyten sein. Beiden Rezeptoren wird eine Beteiligung an immunologischen Erkrankungen, wie der Multiplen Sklerose, der rheumatoiden Arthritis und dem Typ-1-Diabetes zugeschrieben [11;154]. Hinsichtlich der *Helicobacter pylori*-Infektion konnte in immunhistochemischen Untersuchungen nachgewiesen werden, dass CCR5 in der Magenschleimhaut infizierter Kinder signifikant höher exprimiert wird als bei gesunden Patienten [98]. Auch die CC-Chemokine RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β zeigen eine Assoziation mit der Ausprägung der Erkrankung. Bei *Park et al.* [150] war bei *Helicobacter pylori*-Patienten mit peptischem Ulkus eine deutlich höhere MIP-1 α -Expression messbar, als bei der erosiven Gastritis. In einer *in situ*-Studie erbrachten *Ohtani et al.* [145] den Nachweis, dass bei chronischen Gastritiden immunhistochemisch neben CCR5, auch CXCR3 auf mononukleären Zellen vermehrt nachzuweisen ist. In der vorliegenden Arbeit konnte der Chemokinrezeptor CCR5 aufgrund der oben erwähnten Gründe nicht für die Expressionsanalyse verwendet werden. Für CXCR3 hingegen gelang der Nachweis. Bei den *Helicobacter pylori*-infizierten Kindern war eine signifikant niedrigere Expression von CXCR3 festzustellen, wodurch anhand unserer kindlichen Patientenproben eine mögliche geringere Beteiligung dieses Th1-Chemokinrezeptors an der Genese der Infektionskrankheit zu vermuten ist. Im Sinne einer Th1-polarisierten *Helicobacter pylori*-Infektion konnten *Nakajima et al.* [139] nach *in vitro*-Stimulation von T-Lymphozyten eine Assoziation von CXCR3 und IFN- γ nachweisen.

5.3.1.2. IFN-gamma

IFN- γ wird von CD4-/CD8-positiven T-Zellen, NK-Zellen, dendritischen Zellen und B-Zellen produziert und kontrolliert die zelluläre, wie auch die humorale Immunantwort [177;214]. Auf T-Zellebene steht IFN- γ , als Vertreter einer Th1-Antwort, im Zusammenspiel mit vielen Zytokinen, welche von antigen-präsentierenden Zellen sezerniert werden und die IFN- γ -Produktion steuern. IL-4 (Th2) und IL-10 inhibieren die Synthese, während IL-12 (Th1) die Produktion von IFN- γ anregt. Im Rahmen der Th1-dominanten *Helicobacter pylori*-Infektion nimmt IFN- γ eine Schlüsselrolle in der Entzündungsreaktion des betroffenen Gewebes und der Gewebsdestruktion ein [209]. *Mohammadi et al.* [130] und *Sawai et al.* [173] konnten in Mausmodellen zeigen, dass IFN- γ trotz Beteiligung an der *Helicobacter pylori*-induzierten Gewebszerstörung auch an der Reduzierung der bakteriellen Besiedelung beteiligt ist. Bei infizierten Kindern und Erwachsenen waren im Vergleich zu Gesunden in der Magenschleimhaut signifikant höhere IFN- γ -Spiegel nachzuweisen [12;180]. *Bontems et al.* [24] konnten in einer Gegenüberstellung von *Hp*-positiven Kindern und Erwachsenen zeigen, dass die IFN- γ -Expression bei Kindern signifikant geringer ausfällt. Dies würde als mögliche Erklärung gesehen, warum bei Kindern schwere Folgeerkrankungen einer *Helicobacter pylori*-Infektion deutlich seltener vorkommen. *Corvaglia et al.* [34] und *Ashorn et al.* [6] konnten weiter zeigen, dass bei Kindern die serologischen Aktivitätsparameter oft nur schwach oder nicht zu detektieren sind und die Gewebsinfiltration der Granulozyten geringer ausfällt. Im Einklang mit diesen Erkenntnissen konnten wir bei den *Helicobacter pylori*-infizierten Kindern im Vergleich zur magengesunden Studiengruppe eine höhere Expression von IFN- γ messen. Im Sinne des Th1-/Th2-Modells wiesen wir darüber hinaus eine signifikante Korrelation bzw. einen tendenziellen Zusammenhang der Th1-Rezeptoren CXCR3 und TLR4 sowie TLR4 mit IFN- γ nach. Hinsichtlich des Zusammenwirkens von TLR4 und IFN- γ konnten *Schroder et al.* [177] zeigen, dass IFN- γ durch Hochregulation von TLR4 die LPS-induzierte zelluläre Immunantwort verstärkt. *In vitro*-Versuche wiesen nach, dass IFN- γ „geprimte“ Makrophagen schneller und stärker auf die LPS-induzierte Immunantwort reagieren, als unbehandelte Makrophagen. Dieses Zusammenspiel soll laut *Steeg et al.* [189] zu verstärkten Zellschäden führen.

Eine Interaktion von IFN- γ und CXCR3, wie in der Literatur beschrieben, wird anhand des folgenden Modells veranschaulicht. Die Chemokine CXCL9, 10 und 11 (MIG, IP-10 und I-TAC) üben ihre Aktivität via CXCR3 aus, der hauptsächlich auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird. Diese durch IFN- γ -induzierten Chemokine sorgen für eine gerichtete Wanderung dieser T-Zellen zum Ort der Entzündung, wo sie eine Th1-vermittelte Immunantwort auslösen [109;154].

5.3.1.3. IL-12

IL-12 ist ein heterodimeres Zytokin, welches sich aus den Ketten p40 und p35 zusammensetzt, die auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind. Die Expression des p40 Gens ist spezifisch für IL-12 produzierende Zellen. Die Synthese beider Komponenten ist für die biologisch aktive Form p70 erforderlich [42]. *Hsieh et al.* [85], sowie *Song et al.* [188] wiesen in *in vitro*-Studien nach, dass IL-12 hauptsächlich von Phagozyten nach Stimulation mit bakteriellen Antigenen produziert wird und deshalb eine Schlüsselrolle in der Immunantwort gegen bakterielle Infektionen einnimmt. IL-12 wird auch bei *Helicobacter pylori*-infizierten Patienten im Vergleich zu Gesunden signifikant höher exprimiert [13]. Dabei konnten *Bauditz et al.* [13] nachweisen, dass die IL-12-Sekretion parallel zum Aktivitätsgrad der Infektion steigt. Die Untersuchung der IL-12-Expression bei kranken Kindern im Vergleich zu nicht-infizierten und zu Zöliakie-Patienten zeigte anhand der vorliegenden Arbeit, dass IL-12 bei *Helicobacter pylori*-positiven Kindern signifikant höher exprimiert wird. Analog wurde bei Erwachsenen im Rahmen der *Helicobacter pylori*-Infektion laut *Karttunen et al.* [93] und *D'Elis et al.* [43] ein ansteigender IL-12 mRNA-Spiegel beobachtet. Andere Studien hingegen konnten diese Beteiligung von IL-12 an der *Helicobacter pylori*-induzierten Gastritis nicht beweisen [77]. Die Ursache dieser variierenden Ergebnisse kann in den unterschiedlich verwendeten Methoden der Expressionsanalyse, oder in den verschiedenen phänotypischen Varianten des Keimes liegen. Gemeinsam mit IFN- γ ist IL-12 für eine Th1-Differenzierung und eine Unterdrückung der Th2-Antwort verantwortlich. Diesbezüglich konnten *Hida et al.* [81] zeigen, dass IL-12 bei *Helicobacter pylori*-infizierten Patienten mit Duodenalulzera deutlich häufiger zu finden ist, als bei Erwachsenen ohne Ulzerationen. Ob IL-12 dieses Verhalten hinsichtlich der Ulkuserkrankung auch bei Kindern zeigt, konnten wir anhand unserer Arbeit nicht untersuchen.

5.3.2. Th2-Moleküle

5.3.2.1. CCR4

CCR4 ist sowohl an physiologischen, wie auch entzündlichen Vorgängen beteiligt. Seine Wirkung entfaltet CCR4 durch die Interaktion mit den Liganden MDC und TARC [4]. *In vitro* wurde eine selektive Expression von CCR4 auf Th2-Zellen nachgewiesen und gezeigt, dass CCR4-positive Zellen im Sinne einer Th2-Antwort für die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-4 und IL-10 verantwortlich sind [40;170]. Dabei wird dieser Rezeptor insbesondere auf CD4+ T-Lymphozyten exprimiert. Eine Beteiligung von CCR4 an der Pathogenese immunvermittelter Erkrankungen wurde mehrfach gezeigt. So wird CCR4 auf T-Zellen des peripheren Blutes von Patienten mit Morbus Crohn und atopischer Dermatitis vermehrt exprimiert [91;146]. Die Beteiligung von CCR4 an der durch *Helicobacter pylori* verursachten chronischen Gastritis bei Kindern ist bisher nicht untersucht. *Ohtani et al.* [145] zeigten, dass bei Erwachsenen CCR4 im Gegensatz zu CCR5 und CXCR3 im chronisch entzündeten Magen immunhistochemisch nur spärlich exprimiert wird. Dieses Expressionsmuster entspricht der bei der *Helicobacter pylori*-Infektion allgemein angenommenen Th1-dominanten Immunantwort [13;16;44;56;90;108;187]. Dennoch wiesen unsere Daten, im Vergleich zu den magengesunden Kontrollgruppen, auf eine mögliche Beteiligung von CCR4 an der *Helicobacter pylori*-Gastritis von Kindern hin.

Ein, wie in der Literatur beschriebener Zusammenhang zwischen CCR4 und IL-4, konnte in dieser Arbeit aufgrund der nicht nachweisbaren IL-4-Expression nicht gezeigt werden [63]. Hinsichtlich der bei Kindern milder verlaufenden Gastritis können unsere Daten als Hinweis einer verstärkten Th2-Gegenregulation verstanden werden, die als protektive Immunreaktion den Grad der Entzündung und die Keimbelastung zu reduzieren vermag [47;88]. Die durch Th1-assoziierte Zytokine, wie IFN- γ , verursachten Gewebsschäden könnten somit geringer ausfallen [125]. Schwere Folgeerkrankungen der Infektion, welche bei Kindern selten beobachtet werden, bleiben möglicherweise aus.

Granstrom et al. [72] konnten nachweisen, dass bei Kindern spontane Eradikationen häufiger vorkommen als bei Erwachsenen. Dass allerdings eine strikte Trennung Th1- und Th2-vermittelter Immunantworten nicht möglich ist, lässt sich auch anhand von CCR4 verdeutlichen.

Andrew et al. [4] erkannten mittels FACS-Analysen, dass auf CCR4-positiven CD4⁺ T-Lymphozyten auch die Th1-assoziierten Rezeptoren CXCR3 und CCR5 coexprimiert werden. So fanden sich bei 5% der unstimulierten Zellen CCR4/CCR5-, sowie 11% CCR4/CXCR3-doppelt positive CD4⁺ T-Lymphozyten. Diese Daten stehen zu der vorwiegend durch *in vitro*-Versuche etablierten Zuteilung der Rezeptoren zum Th1- oder Th2-Phänotyp im Widerspruch. Eine Möglichkeit ist, dass *ex vivo*-Stimulationen die ursprüngliche Funktion der Zellen verfälschen. Dies kann bei den vorliegenden Untersuchungen ausgeschlossen werden. Bei *Annunziato et al.* [5] führte die Stimulation peripherer T-Zellen mit dem Anti-CD3-Antikörper OKT3 zur vermehrten CCR4-Expression, bei *Rabin et al.* [155] hingegen konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden. Experimentelle Unterschiede, die möglicherweise auf unterschiedliche Ausgangspopulationen der T-Lymphozyten oder verschiedene *in vitro*-Stimulationsmethoden zurückzuführen sind.

5.3.2.2. CRTH2

Prostaglandin D₂ (PGD₂), das an der Entstehung allergischer Erkrankungen beteiligt ist, vermittelt seine biologische Wirkung durch Interaktion mit dem sogenannten DP1-Rezeptor. *Hirai et al.* [83] konnten in einer *in vitro*-Studie nachweisen, dass PGD₂ auch als Agonist von CRTH2 (=DP2) agiert. CRTH2, welches als G-Protein-gekoppelter Rezeptor strukturell der N-Formyl-Rezeptor-Subfamilie (FPR) ähnelt, wird insbesondere auf Th2-Zellen, Eosinophilen und Basophilen exprimiert [35;137]. Außerdem kann CRTH2, angeregt durch Mastzellen, die intrazelluläre Ca²⁺-Mobilisation aktivieren, wodurch der Rezeptor an allergischen Mastzell-vermittelten Entzündungsreaktionen beteiligt ist [137]. *Cosmi et al.* [35] wiesen diesbezüglich nach, dass CRTH2 mit dem Schweregrad der atopischen Dermatitis korreliert und an der Pathogenese des allergischen Asthmas beteiligt ist [105;136]. Dieser Annahme liegt die Tatsache zugrunde, dass insbesondere PGD₂ von aktivierten Mastzellen produziert wird und dadurch CRTH2 indirekt an Th2-vermittelten allergischen Erkrankungen mitwirkt [66]. Der Nachweis einer Beteiligung von CRTH2 an der Pathogenese der *Helicobacter pylori*-Infektion konnte bisher nicht erbracht werden. Auch in der vorliegenden Arbeit war im Expressionsvergleich der infizierten und magengesunden Patienten kein signifikanter CRTH2-Unterschied zu erkennen.

Ein Ergebnis, das angesichts der von *Nagata et al.* [138] *in vivo* nachgewiesenen selektiven Expression von CRTH2 auf Th2-Zellen und seiner Schlüsselrolle in der allergen-induzierten Immunantwort zu erwarten war. *Nagata et al.* [138] konnten in *in vivo*- und *in vitro*-Studien den Beweis erbringen, dass beim Menschen, im Gegensatz zur Maus, CRTH2 nicht auf Th1-Zellen exprimiert wird [1]. Sie wiesen darüber hinaus einen Einfluß von Zytokinen auf CRTH2 nach. Dabei bewirkt das Th2-Zytokin IL-4 eine Steigerung, IL-12 als Vertreter der Th1-Antwort eine Verminderung der CRTH2-Expression [138]. Diese Zusammenhänge konnten wir an unserem Patientenkollektiv nicht zeigen. Hinsichtlich der ebenfalls Th1-dominanten Colitis ulzerosa konnten *Matsuzaki et al.* [121] nachweisen, dass CRTH2-positive Zellen hauptsächlich an der Randzone des entzündeten Gewebeareals zu finden sind. Sie vermuteten, dass die Th2-Antwort insbesondere in der Frühphase der Erkrankung dominiert, oder an der Initiation des Entzündungsprozesses beteiligt ist, die Th1-Antwort hingegen wie auch bei *Helicobacter pylori* für die Gewebsschädigung verantwortlich ist und mit der Aktivität der Colitis ulzerosa korreliert. Dieses Verhalten von CRTH2 konnte anhand unserer Expressionsanalysen nicht untersucht werden. Dafür sind weiterführende histopathologische Gewebsuntersuchungen nötig.

5.3.3. Weitere Zytokine und Rezeptoren

5.3.3.1. IL-10

IL-10 wird hauptsächlich von sogenannten regulatorischen T-Zellen sezerniert. Regulatorische T-Zellen wirken suppressiv auf Effektor-T-Zellen. Als sogenannter „Cytokine synthesis inhibitory factor“ sorgt IL-10 für eine verminderte Synthese pro-inflammatorischer Mediatoren und verringert dadurch den Grad der Entzündung [47;60]. Auch im Rahmen der *Helicobacter pylori*-Infektion konnte, trotz der in der Literatur beschriebenen Th1-dominanten Aktivität, eine erhöhte IL-10-Expression nachgewiesen werden [20;93]. Einerseits löst *Helicobacter pylori* eine IFN- γ -dominante Th1-Antwort aus, andererseits kommt es zu einer vermehrten IL-10-Synthese (Th2), welche, wie oben erwähnt, die Entzündungsreaktion zu reduzieren vermag [20;47]. Dabei hemmt IL-10 insbesondere die Produktion von IFN- γ und TNF- α , sowie von IL-1, IL-6, IL-8 und IL-12 [81]. Zwar würden dadurch die Th1-verursachten Gewebsdefekte reduziert, allerdings könnte, wie *Bodger et al.* [20] vermuten, auch darin die Unfähigkeit des Immunsystems liegen, sich des Keims zu entledigen, was in einem chronischen Infektionsverlauf endet. In Mausmodellen konnte *Eaton et al.* [53] diese protektive Eigenschaft von IL-10 bestätigen. Dabei entwickelten Mäuse, denen die Fähigkeit zur IL-10-Synthese genommen wurde, im Vergleich zu Kontrollmäusen, eine schwere hyperplastische Gastritis. Weiterhin soll IL-10 mit dem Grad der Entzündung, sowie der Keimbelastung assoziiert sein [20].

Im Rahmen unserer *ex vivo*-Versuche konnten wir eine erhöhte IL-10-Expression bei *Helicobacter pylori*-positiven Kindern im Vergleich zur „disease control“ nachweisen. Diese erniedrigten IL-10- Werte im Magenantrum der Zöliakiepatienten sind am ehesten durch eine insbesondere im Duodenum lokalisierte entzündliche Immunreaktion dieser Erkrankung zu erklären. Bei der Untersuchung von Duodenalgewebe von infizierten Kindern und Erwachsenen konnten *Bontems et al.* [24] zeigen, dass bei Kindern die IL-10-Expression höher ausfällt, als bei der erwachsenen Vergleichsgruppe. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass bei Kindern aufgrund einer höheren protektiven Th2-Aktivität die Ausprägung und die Folgeerkrankungen der *Helicobacter pylori*-Infektion geringer ausfallen. Innerhalb der *Helicobacter pylori*-infizierten Patienten konnten wir keinen tendenziellen Zusammenhang von IL-10 und IL-12 (Th1) nachweisen.

Die in der Literatur beschriebene *in vitro* und *in vivo* erhöhte Expression von IL-12 bei der *Helicobacter pylori*-Infektion scheint hierbei durch das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 im Rahmen einer Gegenregulation unterdrückt zu werden [13;74]. *Hida et al.* [81] konnten eine signifikante Korrelation zwischen IL-10 und IL-12 bei *cagA*-positiver *Helicobacter pylori*-Infektion nachweisen. Sie vermuten, dass IL-12 durch die Induktion von IL-10 seine eigene Produktion im Sinne einer negativen Rückkopplung drosselt.

5.3.3.2. TLR2 und TLR4

Elf humane Toll-like-Rezeptoren sind identifiziert, welche durch einen für sie speziellen Liganden aktiviert werden und eine Schlüsselrolle in der Erkennung mikrobieller Pathogene einnehmen [3]. Dabei besitzt diese Rezeptorgattung die Fähigkeit pathogene Keime zu erkennen und die Aktivierung der Immunantwort, sowie von Entzündungsreaktionen zu vermitteln [179]. TLR2 und TLR4 sind die am besten untersuchten Rezeptoren. TLR2 wird vor allem durch Lipoproteine gram-positiver, TLR4 durch Lipopolysaccharide gram-negativer Bakterien aktiviert [27]. *Ortega-Cava et al.* [147] zeigten am Beispiel eines Mausmodells, dass TLR4 und TLR2 hinsichtlich ihrer Lokalisation im Gastrointestinaltrakt ein unterschiedliches Expressionsniveau aufweisen. Dabei wurde TLR4-mRNA insbesondere im distalen, TLR2 hingegen im proximalen Kolon nachgewiesen.

Des Weiteren konnte in einem *in vitro*-Modell gezeigt werden, dass *Helicobacter pylori* die TLR4-Expression auf Epithelzellen des Magens aktiviert und somit zur Th1-vermittelten Entzündungsreaktion beiträgt [192]. Auch *Schmauß et al.* [176] konnten im Antrum und Corpus eine Expression von TLR4, TLR5 und TLR9 bei *Helicobacter pylori*-assoziierter Gastritis belegen. In der vorliegenden Arbeit konnten wir diese in der Literatur beschriebene Beteiligung des Toll-like-Rezeptors 4 an der Pathogenese des *Helicobacter pylori* erkennen. Die *Helicobacter pylori*-positive Studiengruppe zeigte im Vergleich zu den übrigen Patienten den höchsten Expressionswert. Zwischen Patientengruppe 1 und der „disease control“ waren signifikante Unterschiede erkennbar. Für TLR2 konnte zwar der Nachweis einer tendenziell höheren Expression bei infizierten Kindern erbracht werden, allerdings zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Kawahara et al. [94] zeigten, anhand von porcinen Zelllinien, dass TLR4 an der Interaktion von gram-negativen Bakterien und Epithelzellen beteiligt ist und somit im Sinne unserer Ergebnisse eine Immunantwort gegen *Helicobacter pylori* formiert. *Bäckhed et al.* [8] konnten nachweisen, dass die Erkennung des gram-negativen Keimes in der Magenschleimhaut Erwachsener unabhängig von TLR4 verläuft und hierin möglicherweise die Ursache für den meist chronischen Verlauf der Infektion zu finden ist. Dieses, den oben aufgeführten Studien entgegengesetzte Ergebnis, ist vermutlich neben dem ausgewählten Ausgangsgewebe und deren Untersuchungsverfahren auch auf die Tatsache zurückzuführen, dass eine große Interspeziesvariation darin existiert, welche Lipopolysaccharidarten von TLR4 erkannt werden und welche nicht [78]. *Hajjar et al.* [78] konnten feststellen, dass bei der Maus im Gegensatz zum Menschen TLR4 hypoacetylierte Lipopolysaccharide, welche in der Außenmembrane von *Helicobacter pylori* zu finden sind erkennt. Ob nun die Infektion bei Kindern im Vergleich zu Erwachsenen, wie unsere Daten vermuten lassen, über TLR4 verläuft und somit einen Grund für den milderen Verlauf darstellt, sollte anhand großer Fallstudien an Kindern und Erwachsenen verifiziert werden. Der in der Literatur beschriebene Zusammenhang von TLR4 und einer bevorzugten IL-10- sowie IL-12-Expression konnte anhand der vorliegenden Arbeit nicht hergestellt werden [82;158]. Vielmehr zeigte sich im Sinne einer durch TLR4 induzierten Th1-Antwort eine signifikante Korrelation der TLR4-Expression mit dem Th1-Markern CXCR3 und ein tendenzieller Zusammenhang zu IFN- γ . *Shi et al.* [179] betonen, dass die vorwiegend auf dendritischen Zellen exprimierten Toll-like-Rezeptoren eine wichtige Verbindung zwischen Antigenerkennung und Induktion der T-Zellantwort darstellen.

5.3.4. Expression und Sydney-Klassifikation sowie Expression und Alter

In der vorliegenden Arbeit konnten wir keine signifikante Korrelation der mRNA-Expression und der Sydney-Klassifikation nachweisen. Dies widerspricht der allgemein angenommenen Vermittlung der Inflamationsreaktion bei *Helicobacter pylori* durch eine dominante Th1-Immunantwort [81;187]. In der Literatur wird ein Zusammenhang der Zytokinexpression und dem Schweregrad der Gastritis anhand der Sydney-Klassifikation beschrieben. So wurde von *Bauditz et al.* [13] anhand *Helicobacter pylori*-infizierter Patienten gezeigt, dass der Anstieg der Gastritisaktivität mit der Sekretion des Th1-Markers IL-12 korreliert. *Shimoyama et al.* [181] konnten einen signifikanten Zusammenhang der IL-8 mRNA-Expression und dem Infiltrationsgrad der Magenmukosa durch Neutrophile nachweisen. Wie bereits in Kapitel 1.1.2. erwähnt, ist IL-8 im Rahmen der *Helicobacter pylori*-Infektion als potenter inflammatorischer Mediator an der Durchsetzung des entzündeten Gewebes mit neutrophilen Granulozyten beteiligt. Umgekehrt konnten *Strömberg et al.* [191] diese Korrelation nicht beweisen. Vielmehr zeigten die Ergebnisse ihrer Versuche, dass der Grad der Inflammation keinen Einfluß auf den Zytokinlevel zu haben scheint. Einen Zusammenhang der Chronizität und der Zytokinexpression von IL-8, sowie IL-12 konnten wir in unseren Versuchen nicht belegen.

Hinsichtlich der Berechnung der Korrelationen zwischen Expression und Alter der Patienten zeigte sich in der Betrachtung der Patientengruppen 1, 2 und 3 lediglich für die Moleküle CCR4 in der „disease control“-Gruppe 3, sowie für TLR2 in den Patientengruppen 1 und 2 signifikante Zusammenhänge des Alters zur Expression. Für die übrigen Moleküle konnten für die einzelnen Gruppen keine signifikanten Korrelationen nachgewiesen werden. Somit sind die Expressionsunterschiede nicht auf das unterschiedliche Alter zurückzuführen, sondern sind als Ausdruck der einzelnen Erkrankungen zu interpretieren.

6. Zusammenfassung

6.1. Hintergrund und Fragestellung

Die Auseinandersetzung des Körpers mit Antigenen löst eine spezifische Immunantwort aus. Im Falle der *Helicobacter pylori*-Infektion kommt es zu einer humoralen und zellulären Abwehrreaktion des Immunsystems. Die an der zellulären Immunantwort beteiligten Th-Zellen lassen sich anhand ihres Zytokinmusters in Th1- und Th2-Zellen unterteilen. Th1-Zellen sind durch die Produktion von IFN- γ und IL-2, Th2-Zellen durch IL-4 und IL-5 charakterisiert. Eine Unterteilung der T-Zellen lässt sich auch anhand von Chemokinrezeptoren vornehmen. Th1-Zellen exprimieren vor allem die Rezeptoren CCR5 und CXCR3, Th2-Zellen hingegen CCR3 und CCR4. Im Rahmen der *Hp*-Infektion kommt es zu einer Th1-dominanten Immunantwort, die im Infektionsverlauf zu einer ansteigenden Entzündungsreaktion mit Zelldefekten führt. Hinsichtlich des Krankheitsverlaufes und ihrer Folgeerkrankungen lassen sich bei Erwachsenen und Kindern Unterschiede erkennen. So zeigen sich bei Kindern eine geringere Aktivität der Antrumgastritis und ein geringeres Ausmaß der Schleimhautatrophie. Darüber hinaus wurden bei Kindern häufiger spontane Eradikationen beobachtet. Weiter wird das Th1-Zytokin IFN- γ , welches für die Entstehung *Hp*-vermittelter Gewebsdefekte mitverantwortlich ist, bei Kindern signifikant geringer exprimiert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die kindliche Immunantwort gegen *Helicobacter pylori* besser zu charakterisieren. Hierin könnte die Grundlage einer „immunologischen“ Behandlungsoption der Infektion gelegt werden.

6.2. Methode

Für die vorliegende Arbeit wurden 39 pädiatrische Patienten im Alter von sechs Monaten bis 16 Jahren untersucht, welche in der Gastroenterologischen Abteilung des Dr. von Haunerschen Kinderspital der LMU unter der Leitung von Frau Prof. Dr. med. S. Koletzko endoskopiert wurden. Anhand ihrer klinischen, endoskopischen, mikrobiologischen und histologischen Befunde wurden die Patienten in drei Gruppen eingeteilt. Die Patientengruppe 1 umfasste insgesamt 15 Kinder mit gesicherter *Helicobacter pylori*-Infektion. Von den übrigen 24 Patienten, ohne *Helicobacter pylori*-Infektion wurden 13 Kinder als magengesunde

Kontrollgruppe (Gruppe 2) eingestuft und 11 Kinder mit frisch diagnostizierter Zöliakie, einer ebenfalls Th1-dominanten Erkrankung, als „disease control“ der Gruppe 3 zugeteilt. Aus endoskopisch gewonnenem Magengewebe wurde anhand eines standardisierten Extraktionsprotokolls die RNA isoliert. Nach Umschreibung in cDNA wurde mittels Real-time RT-PCR die mRNA-Expression von CCR4, CCR5, CXCR3, CRTH2, TLR2, TLR4, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-12 und IL-13 in Duplikaten und zwei unabhängigen Läufen quantifiziert. Die Normierung der Mittelwerte erfolgte zu GAPDH. Werte mit einer Differenz von >20% zwischen den beiden PCR-Läufen wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die Magenbiopsien aus dem Antrum wurden kodiert und ohne Wissen klinischer Informationen von einer Pathologin nach der modifizierten Sydneyklassifikation für Gastritis befundet. Für die statistische Auswertung wurde zur Berechnung der Signifikanzen (p) im Gruppenvergleich der *Mann-Whitney-U-Test* verwendet. Korrelationen (r) wurden nach *Spearman-rho* berechnet.

6.3. Ergebnisse

Aufgrund ausbleibender mRNA-Expression in der Real-time RT-PCR konnten die Zytokine IL-4, IL-5, IL-8 und IL-13 nicht für die Analysen berücksichtigt werden. Anlässlich nachgewiesener unspezifischer Amplifikate in der Gelelektrophorese musste der Th1-Chemokinrezeptor CCR5 aus der Auswertung ausgeschlossen werden. Verglichen mit Gesunden und Zöliakiepatienten hatten die *Hp*-positiven Kinder eine höhere CCR4- ($p=0,038^*$; $p=0,042^*$), IL-12- ($p=0,002^*$; $p=0,005^*$), IFN- γ - ($p=0,132$; $p=0,083$), IL-10- ($p=0,425$; $p=0,007^*$) und TLR 4- ($p=0,050$; $p=0,019^*$) mRNA-Expression, aber eine niedrigere Expression von CXCR3 ($p=0,015^*$; $p=0,004^*$). Das Molekül IL-10 wurde im Magenbiopsat der Patienten mit einer diagnostizierten Zöliakie nicht exprimiert, was als möglicher Hinweis auf eine Störung der regulatorischen Zellen bei dieser Autoimmunkrankheit interpretiert werden kann. Die Rezeptoren TLR2 und CRTH2 zeigten im Vergleich der mRNA-Expression der Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Innerhalb der Gruppe der *Helicobacter pylori*-infizierten Kinder fand sich eine signifikante Korrelation der Zytokin- und Chemokinrezeptor-Expression untereinander. Dabei korrelierte TLR4 mit CXCR3 und IFN- γ , sowie mit CCR4.

Allerdings fand sich innerhalb der Gruppen keine Korrelation zwischen der mRNA-Expression der gemessenen Moleküle mit dem Schweregrad der Gastritis, ausgedrückt entsprechend der modifizierten Sydney-Klassifikation als Aktivität (Granulozyteninfiltration) und Chronizität der Gastritis (Intiltration mit mononukleären Zellen), Atrophie und Bakteriendichte.

4. Schlussfolgerungen

- In unstimulierten Antrumbiopsien ist die Quantifizierung der Th1-Moleküle CXCR3, IFN- γ und IL-12, der Th2-Moleküle CCR4 und CRTH2 sowie von IL-10 und der Toll-like Rezeptoren TLR2 und TLR4 mittels Real-time-PCR möglich.
- In der Magenschleimhaut *Helicobacter pylori*-infizierter Kinder ist im Vergleich zur magengesunden Kontrollgruppe die Expression von IL-12 (Th1), CXCR3 (Th1) und CCR4 (Th2) signifikant erhöht bzw. erniedrigt. Somit ist bei Kindern neben einer Th1-Antwort eine zusätzliche Th2-Reaktion zu vermuten.
- Das Molekül IL-10 wird bei *Hp*-positiven Kindern möglicherweise von regulatorischen T-Zellen zur Begrenzung der entzündlichen Immunantwort gebildet.
- Mit der Bestätigung einer tendenziell höheren Expression von IFN- γ bei infizierten Kindern konnten wir die Beteiligung des gewebst destruktiven Th1-Markers an der Pathogenese der *Helicobacter pylori*-Infektion unterstreichen.
- Vermutlich spielt der Toll-like-Rezeptor TLR4 im Magen eine wichtige Rolle in der Erkennung *Hp*-assoziierter Lipopolysaccharide.

7. Anhang

7.1. Literaturverzeichnis

- [1] Abe H, Takeshita T, Nagata K, Arita T, Endo Y, Fujita T, Takayama H, Kubo M, Sugamura K. Molecular cloning, chromosome mapping and characterization of the mouse CRT2 gene, a putative member of the leukocyte chemoattractant receptor family. *Gene* 1999; 227: 71-77.
- [2] Agace WW, Roberts AI, Wu L, Greineder C, Ebert EC, Parker CM. Human intestinal lamina propria and intraepithelial lymphocytes express receptors specific for chemokines induced by inflammation. *Eur. J. Immunol.* 2000; 30: 819-826.
- [3] Akira S, Hoshino K and Kaisho T. The role of Toll-like receptors and MyD88 in innate immune responses. *J. Endotoxin Res.* 2000; 6: 383-387.
- [4] Andrew DP, Ruffing N, Kim CH, Miao W, Heath H, Li Y, Murphy K, Campbell JJ; Butcher EC, Wu L. C-C Chemokine receptor 4 expression defines a major subset of circulating nonintestinal memory T cells of both Th1 and Th2 potential. *J. Immunol.* 2001; 166: 103-111.
- [5] Annunziato F, et al. Assessment of chemokine receptor expression by human Th1 and Th2 cells in vitro and in vivo. *J. Leukoc. Biol.* 1999; 65: 691-699.
- [6] Ashorn M, Ruuska T, Karikoski R, Valipakka J, Maki M. Gastric mucosal cell densities in Helicobacter pylori-positive and -negative dyspeptic children and healthy controls. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1994; 18: 146-151.
- [7] Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 1997; 15: 563-591.
- [8] Bäckhed F, Rokbi B, Torstensson E, Zhao Y, Nilsson C, Segiun D, Nomark S, Buchan AMJ, Richter-Dahlfors A. Gastric mucosal recognition of Helicobacter pylori is independent of toll-like receptor 4. *J. Infect. Dis.* 2003; 187: 829-836.
- [9] Baggiolini M, Dewald B and Moser B. Human chemokines: an update. *Annu. Rev. Immunol.* 1997; 15: 675-705.
- [10] Bakka AS, Salih BA. Prevalence of Helicobacter pylori infection in asymptomatic subjects in Libya. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2002; 43: 265-268.

- [11] Balashov KE, Rottman JB, Weiner HL, Hancock WW. CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999; 96: 6873-6878.
- [12] Bamford KB, et al. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology* 1998; 114: 482-492.
- [13] Bauditz J, Ortner M, Bierbaum M, Niedobitek G, Lochs H, Schreiber S. Production of IL-12 in gastritis relates to infection with *Helicobacter pylori*. *Clin. Exp. Immunol.* 1999; 117: 316-323.
- [14] Berg K, Chatterjee A, Yasmin T, Shara M, Bagchi D. Cytokine expression due to *Helicobacter pylori* in a tissue culture model. *Mol. Cell. Biochem.* 2006; Dec. 8.
- [15] Biron CA, Gazzinelli RT. Effects of IL-12 on immune responses to microbial infections: a key mediator in regulating disease outcome. *Curr. Opin. Immunol.* 1995; 7: 485-496.
- [16] Blaser M, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J. Clin. Invest.* 2004; 113: 321-333.
- [17] Blaser MJ et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* associated with an increased risk of adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* 1995; 55: 2111-2115.
- [18] Blaser MJ. Role of *vacA* and the *cagA* locus of *Helicobacter pylori* in human disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1996; 10: 73.
- [19] Bode G, Brenner H, Adler G, Rothenbacher D. Recurrent abdominal pain in children: evidence from a population-based study that social and familial factors play a major role but not *Helicobacter pylori* infection. *J. Psychosom. Res.* 2003; 54: 417-421.
- [20] Bodger K, Bromelow K, Wyatt JI, Heatley RV. Interleukin 10 in *Helicobacter pylori*-associated gastritis: immunohistochemical localisation and in vitro effects on cytokine secretion. *J. Clin. Pathol.* 2001; 54: 285-292.
- [21] Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* 1997; 15: 749-795.
- [22] Bohmeyer J, Heller A, Hartig C, et al. Association of chronic urticaria with *Helicobacter pylori*-induced antrum gastritis. *Hautarzt* 1996; 47: 106-108.

- [23] Boncristiano M, Paccani SR, Barone S, et al. The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J. Exp. Med.* 2003; 198:1887-1897.
- [24] Bontems P, Robert F, van Gossom A, Cadranel S, Mascart F. *Helicobacter pylori* modulation of gastric and duodenal mucosal T cell cytokine secretions in children compared with adults. *Helicobacter* 2003; 8: 216ff..
- [25] Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endo.* 2000; 25: 169-193.
- [26] Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endo.* 2002; 29: 23-39.
- [27] Cario E, Brown D, McKee M, Lynch-Devaney K, Gerken G and Podolsky DK. Commensal-associated molecular patterns induce selective toll-like receptor-trafficking from apical membrane to cytoplasmic compartments in polarized intestinal epithelium. *Am. J. Pathol.* 2002; 160: 165-173.
- [28] Cave DR. Transmission and epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Am. J. Med.* 1996; 100: 12.
- [29] Chelimsky G, Blanchard SS, Czinn SJ. *Helicobacter pylori* in children and adolescents. *Adolesc. Med.* 2004; 15: 53-66.
- [30] Chowers MY, et al. A defined human gastrin sequence stimulates the growth of *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2002; 217: 231-236.
- [31] Chuang CH, Sheu BS, Yang HB, Kao AW, Cheng HC, Yao WJ. Hypergastrinemia after *Helicobacter pylori* infection is associated with bacterial load and related inflammation of the oxyntic corpus mucosa. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2004; 19(9): 988-993.
- [32] Clark-Lewis I, Kim KS, Rajarathnam K, Gong JH, Dewald B, Moser B, Baggiolini M, Sykes BD. Structure-activity relationships of chemokines. *J. Leukoc. Biol.* 1995; 57: 703-711.
- [33] Cohen H. Peptic ulcer and *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol. Clin. North. Am.* 2000; 29: 775-789.

- [34] Corvaglia L, Bontems P, Devaster JM, et al. Accuracy of serology and ¹³C-urea breath test for detection of *Helicobacter pylori* in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1999; 18: 976-979.
- [35] Cosmi L, Annunziato F, Galli MIG, Maggi RME, Nagata K, Romagnani S. CRTH2 is the most reliable marker for the detection of circulating human type 2 Th and type 2 T cytotoxic cells in health and disease. *Eur. J. Immunol.* 2000; 30: 2972-2979.
- [36] Crabtree JE, et al. Musosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. *Lancet* 1991; 338: 332-335.
- [37] Crabtree JE, Peichl P, Wyatt JI, et al. Gastric interleukin-8 and IgA IL-8 autoantibodies in *Helicobacter pylori* infection. *Scand. J. Immunol.* 1993; 37: 65.
- [38] Crabtree JE. Gastric musosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1996; 10: 29.
- [39] Crabtree JE. Role of cytokines in pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced mucosal damage. *Dig. Dis. Sci.* 1998; 43: 46-55.
- [40] D'Ambrosio D, Iellem A, Bonecchi R, Mazzeo D, Sozzani S, Mantovani A, Sinigaglia F. Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. *J. Immunol.* 1998; 161: 5111-5115.
- [41] D'Ambrosio D, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F. Chemokine receptors in inflammation: an overview. *J. Immunol. Meth.* 2002; 273: 3-13.
- [42] D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante NM, et al. Production of natural killer cell stimulating factor (NKSF/IL-12) by peripheral blood mononuclear cells. *J. Exp. Med.* 1992; 176: 1387-1398.
- [43] D'Elis MM, Manghetti M, Almerigogna F, et al. 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.
- [44] D'Elis MM, Manghetti M, De Carli M, et al. T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J. Immunol.* 1997; 158: 962-967.
- [45] Das BK, Kakkar S, Dixit VK, Kumar M, Nath G, Mishra OP. *Helicobacter pylori* infection and recurrent abdominal pain in children. *J. Trop. Pediatr.* 2003; 49: 250-252.

- [46] De Giacomo C, Gianatti A, Negrini R, Perotti P, Bawa P, Maggiore G, Fiocca R. Lymphocytic gastritis: a positive relationship with celiac disease. *J. Pediatr.* 1994; 124: 57-62.
- [47] Del Giudice G, Michetti P. Inflammation, Immunità and Vaccines for *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2004; 9: 23-28.
- [48] Di Campli C, Gasbarrini A, Numera E, et al. Beneficial effects of *Helicobacter pylori* eradication on idiopathic chronic urticaria. *Dig. Dis. Sci.* 1998; 43: 1226-1229.
- [49] Di Tommaso A, Xiang Z, Bugnoli M, et al. *Helicobacter pylori*-specific CD4⁺ T-cell clones from peripheral blood and gastric biopsies. *Infect. Immun.* 1995; 63: 1102.
- [50] Drumm B, Koletzko S, Oderda G. *Helicobacter pylori* infection in children: a consensus statement. Medical Position Paper: report of the European Paediatric Task Force on *Helicobacter pylori* on a Consensus Conference, Budapest, Hungary, September 1998. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2000; 30: 207-213.
- [51] Drumm B. *Helicobacter pylori* in pediatric patient. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 1993; 22: 169-182.
- [52] Dzierzanowska-Fangrat K, Raeiszadeh M, Dzierzanowska D, Gladkowska-Dura M, Celinska-Cedro D and Crabtree JE. IgG subclass response to *Helicobacter pylori* and *cagA* antigens in children. *Clin. Exp. Immunol.* 2003; 134: 442.
- [53] Eaton KA, Mefford M, Thevenot T. The role of T cell subsets and cytokines in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* gastritis in mice. *J. Immunol.* 2001; 166: 7456-7461.
- [54] Edwards DR, Denhardt DT. A study of mitochondrial and nuclear transcription with cloned cDNA probes. Changes in the relative abundance of mitochondrial transcripts after stimulation of quiescent mouse fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 1985; 157: 127-143.
- [55] Elitsur Y, Raghuverra A, Sadat T, Vaid P, et al. Is gastric nodularity a sign for gastric inflammation associated with *Helicobacter pylori*-infection in children? *J. Clin. Gastroenterol.* 2000; 30: 286-288.
- [56] Elliott SN, Ernst PB, Kelly CP. The year in *Helicobacter pylori* 2001: Molecular inflammation. *Curr. Opin. Gastroenterol. Suppl.* 2001; 17: 12.
- [57] El-Omar EM, et al. *Helicobacter pylori* infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease. *Gastroenterology* 1995; 109: 681-691.

- [58] Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 1983; 132: 6-13.
- [59] Figura N. Helicobacter pylori exotoxins and gastroduodenal diseases associated with cytotoxic strain infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1996; 10: 79.
- [60] Fiorentino DF, Zlotnik A, Mossmann TR, et al. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.* 1991; 147: 3815-3822.
- [61] Fox JG. Non-human reservoirs of Helicobacter pylori. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1995; 9: 93.
- [62] Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* 1999; 26: 112-122, 124-125.
- [63] Galli G, et al. Macrophage-derived Chemokine production by activated human T cells in vitro and in vivo: preferential association with the production of type 2 cytokines. *Eur. J. Immunol.* 2000; 30: 204-210.
- [64] Ganga-Zandzou PS, Michaud L, Vincent P, Husson MO, Wizla-Derambure N, Delassalle EM, Turck D, Gottrand F. Natural outcome of Helicobacter pylori infection in asymptomatic children: a two-year follow-up study. *Pediatrics* 1999; 104: 216-221.
- [65] Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, et al. Clinical relevance of the Helicobacter pylori gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 12778.
- [66] Gervais FG, Cruz RPG, Chateaufneuf A, Gale S, Sawyer N, Nantel F, Metters KM, O'Neill GP. Selective modulation of chemokinesis, degranulation and apoptosis in eosinophils through the PGD2 receptors CRTH2 and DP. *Allergy Clin. Immunol.* 2001; 108: 982-988.
- [67] Gold BD, Colletti RB, Abbott M, et al. Helicobacter pylori infection in children: recommendations for diagnosis and treatment. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2000; 31: 490-497.
- [68] Gold BD. New Approaches to Helicobacter pylori Infection in Children. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 2001; 3: 235-247.
- [69] Goodman KJ, Correa P, Tengana Aux HJ, et al. Helicobacter pylori infection in the Columbian Andes: A population-based study of transmission pathways. *Am. J. Epidemiol.* 1996; 144: 290.

- [70] Goodman KJ, Correa P. The transmission of *Helicobacter pylori*. A critical review of the evidence. *Int. J. Epidemiol.* 1995 ; 24: 875-887.
- [71] Goodwin CS, Worsley BW. Microbiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 1993; 22: 5.
- [72] Granstrom M, Tindberg Y, Blennow M. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in ancohort of children monitored from 6 months to 11 years of age. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35: 468-470.
- [73] Graham DY, Malaty HM, Evans DG, et al. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. Effect of age, race and socio-economic status. *Gastroenterology* 1991; 101: 1495.
- [74] Guiney DG, Hasegawa P, Cole SP. *Helicobacter pylori* preferentially induces interleukin 12 (IL-12) rather than IL-6 or IL-10 in human dendritic cells. *Infect. Immun.* 2003; 71: 4163-4166.
- [75] Guiraldes E, Duarte I, Pena A, Godoy A, Espinosa MN, Bravo R, Larrain F, Schultz M, Harris P. Proinflammatory cytokine expression in gastric tissue from children with *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2001; 33: 127-132.
- [76] Guo D, Henriksson R, Hedman H. The icyclerIQ detection system for evaluating reference gene expression in normal human tissue. *Tech note 2804*. Biorad.
- [77] Haeberle HA, Kubin M, Bamford KB, et al. Differential expression of interleukin -12 (IL-12) and IL-10 by live and killed *Helicobacter pylori* in vitro and association of IL-12 production with gamma-interferon-producing T cells in human gastric mucosa. *Infect. Immunol.* 1997; 65: 4229-4235.
- [78] Hajjar AM, Ernst RK, Tsai JH, Wislon CB, Miller SI, Human toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nat. Immunol.* 2002; 3: 354-359.
- [79] Hansson LE, et al. *Helicobacter pylori* infection: independent risk indicator of gastric adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1993; 105: 1098-1103.
- [80] Hein J, Schellenberg U, Bein G, Hackstein H. Quantification of murine IFN- γ mRNA and protein expression: Impact of real-time kinetic RT-PCR using SYBR green I Dye. *Scand. J. Immunol.* 2001; 54: 285-291.

- [81] Hida N, Shimoyama T Jr, Neville P, Dixon MF, Axon ATR, Shimoyama T Sr, Crabtree JE. Increased expression of IL-10 and IL-12 (p40) mRNA in *Helicobacter pylori* infected gastric mucosa: relation to bacterial cag status and peptic ulceration. *J. Clin. Pathol.* 1999; 52: 658-664.
- [82] Higgins SC, Lavelle EC, McCann C, et al. Toll-like receptor 4-mediated innate IL-10 activates antigen-specific regulatory T cells and confers resistance to *Bordetella pertussis* by inhibiting inflammatory pathology. *J. Immunol.* 2003; 171: 3119-3127.
- [83] Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, Ichimasa M, Sugamura K, Nakamura M, Takano S, Nagata K. Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J. Exp. Med.* 2001; 193: 255-261.
- [84] Holck S, Norgaard A, Bennedsen M, et al. Gastric mucosal cytokine responses in *Helicobacter pylori*-infected patients with gastritis and peptic ulcers. Association with inflammatory parameters and bacteria load. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2003; 36: 175-180.
- [85] Hsieh C, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of Th1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* 1993; 260: 547-549.
- [86] Hulten K, Han SW, Enroth H, et al. *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterology* 1996; 110: 1031.
- [87] Imrie C, Rowland M, Bourke B, Drumm B. Is *Helicobacter pylori* infection in childhood a risk factor for gastric cancer ?. *Pediatrics* 2001; 107: 373-380.
- [88] Ismail HF, Zhang J, Lynch RG, et al. Role for complement in development of *Helicobacter*-induced gastritis in interleukin-10-deficient mice. *Infect. Immunol.* 2003; 71: 7140-7148.
- [89] Itoh T, Wakatsuki Y, Yoshida M, et al. The vast majority of gastric T cells are polarized to produce T helper 1 type cytokines upon antigenic stimulation despite the absence of *Helicobacter pylori* infection. *J. Gastroenterol.* 1999; 34: 560-570.
- [90] Itoh T, Yoshida M, Chiba T, Kita T and Wakatsuki Y. A coordinated cytotoxic effect of IFN γ and cross-reactive antibodies in the Pathogenesis of *Helicobacter pylori* gastritis. *Helicobacter* 2003; 8: 268.

- [91] Jo Y, Matsumoto T, Yada S, Fujisawa K, Esaki M, Onai N, Matsushima K, Iida M. CCR4 is an up-regulated Chemokine receptor of peripheral blood memory CD4⁺ T cells in Crohn's disease. *Clin. Exp. Immunol.* 2003; 132: 332-338.
- [92] Jonaitis LV, Kiudelis G, Kupcinskas L. Characteristics of patients with erosive and nonerosive GERD in high-Helicobacter pylori prevalence region. *Dis. Esophagus* 2004; 17: 223-227.
- [93] 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: 22-27.
- [94] Kawahara T, Teshima S, Oka A, Sugiyama T, Kishi K, Rokutan K. Type I Helicobacter pylori lipopolysaccharide stimulates toll-like receptor 4 and activates mitogen oxidase 1 in gastric pit cells. *Infect. Immun.* 2001; 69: 4382-4389.
- [95] Kellogg DE, Sninsky JJ, Kwok S. Quantitation of HIV-1 proviral DNA relative to cellular DNA by the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 1990; 189: 202-208.
- [96] Koletzko S, Haisch M, Seeboth I, Braden B, Hengels K, Koletzko B, Hering P. Isotype-selective non-dispersive infrared spectrometry for detection of Helicobacter pylori infection with ¹³C-urea breath test. *Lancet* 1995; 345: 961-962.
- [97] Koletzko S, et al. Prospective multicentre study on antibiotic resistance of Helicobacter pylori strains obtained from children living in Europe. *Gut* 2006; 55: 1711-1716.
- [98] Krauss-Etschmann S, Sammler E, Koletzko S, Konstantopoulos N, Aust D, Gebert B, Luckow B, Reinhardt D and Schendel DJ. Chemokine receptor 5 expression in gastric mucosa of Helicobacter pylori-infected and noninfected children. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 2003; 10: 22-29.
- [99] Krauss-Etschmann S, Gruber R, Plikat K, Antoni I, Demmelmair H, Reinhardt D and Koletzko S. Increase of Antigen-presenting cells in the gastric mucosa of Helicobacter pylori-infected children. *Helicobacter* 2005; 10 (3): 214-222.
- [100] Kindermann A, Demmelmair H, Koletzko B, Krauss-Etschmann S, Wiebecke B, Koletzko S. Influence of age on ¹³C-urea breath test results in children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2000; 30: 85-91.

- [101] Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Myambo K, Drummond R, Gelfand DH. Isolation, Characterization, and Expression in *Escherichia coli* of the DNA Polymerase Gene from *Thermus aquaticus*. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 6427-6437.
- [102] Lekanne Deprez RH, Fijnvandraat AC, Ruijter JM, Moorman AFM. Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Analy. Biochem.* 2002; 307: 63-69.
- [103] Letley DP, Rhead JL, Twells RJ, et al. Determinants of non-toxicity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 26734.
- [104] Levi S, et al. *Campylobacter pylori* and duodenal ulcers: the gastrin link. *Lancet* 1989; 1: 1167-1168.
- [105] Lewis RA, Soter NA, Diamond PT, Austen KF, Oates JA, Roberts LJ 2nd. Prostaglandin D2 generation after activation of rat and human mast cells with anti-IgE. *J. Immunol.* 1982; 129: 1627-1631.
- [106] Liang S, Redlinger T. A protocol for isolating putative *Helicobacter pylori* from fecal specimens and genotyping using *vacA* alleles. *Helicobacter* 2003; 8: 561-567.
- [107] Lin JT. *Helicobacter pylori* infection in children – the role of infrafamilial clustering. *Acta Paediatr. Taiwan* 2003; 44: 325-326.
- [108] Lindholm C, Quiding-Jarbrink M, Lonroth H, Hamlet A, Svennerholm AM. Local cytokine response in *Helicobacter pylori* gastritis display a Th1 phenotype. *Infect. Immun.* 1998; 66: 5964 –5971.
- [109] Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, et al. Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1996; 184: 963-969.
- [110] Loetscher P, Clark-Lewis I. Agonistic and antagonistic activities of chemokines. *J. Leukoc. Biol.* 2001; Vol.69: 881-884.
- [111] Logan RP. Adherence of *Helicobacter pylori*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1996; 10: 3.
- [112] Lizza F, Parrello T, Sebkova L, Pensabene L, Imeneo M, Mancuso M, La Vecchia AM, Monteleone G, Strisciuglio P, Pallone F. Expression of proinflammatory and Th1 but not Th2 cytokines is enhanced in gastric mucosa of *Helicobacter pylori* infected children. *Digest. Liver Dis.* 2001; 33: 14-20.
- [113] Machado JC, et al. A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2003; 125: 364-371.

- [114] Mackay CR. Chemokines: Immunology's high impact factor. *Nature Immunology* 2001; 2: 95-101.
- [115] Mackay CR. Chemokines: what chemokine is that ?. *Curr. Biol.* 1997; 7: 384-386.
- [116] Mackay CR. Dual personality of memory T cells. *Nature* 1999; 401: 659-660.
- [117] Malaty HM, Engstrand L, Pedersen NL, Graham DY. Helicobacter pylori infection: Genetic and environmental influences. A study of twins. *Ann. Intern. Med.* 1994; 120: 982.
- [118] Malboeuf CM, Isaacs SJ, Tran NH, Kim B. Thermal effects on reverse transcription: improvement of accuracy and processivity in cDNA synthesis. *Biotechniques* 2001; 30: 1074.
- [119] Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1: 1311.
- [120] Marshall BJ. History of the discovery of C. pylori. *Campylobacter pylori in gastritis and peptic ulcer disease*, Blaser MJ (Ed), Igaku-Shoin, New York 1998. p.7.
- [121] Matsuzaki K, Hokari R, Kato S, Tsuzuki Y, Tanaka H, Kurihara C, Iwai A, Kawaguchi A, Nagao S, Itoh K, Nagata K, Miura S. Differential expression of CCR5 and CRTH2 on infiltrated cells in colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2003; 18: 1081-1088.
- [122] Matysiak-Budnik T, Megraud F. Epidemiology of Helicobacter pylori infection with special reference to professional risk. *J. Physiol. Pharmacol.* 1997; 48: 3-17.
- [123] Mayer, Lloyd. Mucosal immunity and gastrointestinal antigen processing. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2000; Vol.30 (1): 4-12.
- [124] Megraud F. Transmission of Helicobacter pylori: Fecal-oral versus oral-oral route. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1995; 9: 85.
- [125] Meining A, Behrens R, Lehn N, Bayerdorffer E, Stolte M. Different expression of Helicobacter pylori gastritis in children: evidence for a specific pediatric disease ? *Helicobacter* 1996; 1: 92-97.
- [126] Misiewicz JJ. The Sydney system: a new classification of gastritis. Introduction. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1991;6: 207-208.
- [127] Mitchell HM, Hazel SL, Kolesnikow T, et al. Antigen recognition during progression from acute to chronic infection with a cagA-positive strain of Helicobacter pylori. *Infect. Immun.* 1996; 64: 1166.

- [128] Mitchell HM, Mascord K, Hazell SL, Daskalopoulos G. Association between the IgG subclass response, inflammation and disease status in *Helicobacter pylori* infection. *Scand. J. Gastroenterol.* 2001; 36: 149-155.
- [129] Mobley HL. The role of *Helicobacter pylori* urease in the pathogenesis of gastritis and peptic ulceration. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1996; 10: 57.
- [130] Mohammadi M, Czinn S, Redline R, Nedrud J. *Helicobacter*-specific cell-mediated immune responses display a predominant Th1 phenotype and promote a delayed-type hypersensitivity response in the stomachs of mice. *J. Immunol.* 1996; 156: 4729-4738.
- [131] Monteleone G, Del Vecchio Blanco G, Palmieri G, Vavas P, Monteleone I, Colantoni A, Battista S, Spagnoli LG, Romano M, Borrelli M, MacDonald TT, Pallone F. Induction and regulation of Smad7 in the gastric mucosa of patients with *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 2004; 126: 674-682.
- [132] Moser B and Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nature Immunology* 2001; 2: 123-128.
- [133] Moss SF, Legan S, Davies J, et al. Cytokine gene expression in *Helicobacter pylori* associated antral gastritis. *Gut* 1994; 35: 1567.
- [134] Murakami K, Kodama M, Fujioka T. Latest insights into the effects of *Helicobacter pylori* infection on gastric carcinogenesis. *World J. Gastroenterol.* 2006; 12: 2713-2720.
- [135] Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* 2000; 52: 145-176.
- [136] Murray JJ, Tonnel AB, Brash AR, Roberts LJ 2nd, Gosset P, Workman R, Capron A, Oates JA. Release of prostaglandin D2 into human airways during acute antigen challenge. *N. Engl. J. Med.* 1986; 315: 800-804.
- [137] Nagata K, Hirai H, Tanaka K, Ogawa K, Aso T, Sugamura K, Nakamura M, Takano S. CRTH2, an orphan receptor of T-helper-2-cells, is expressed on basophils and eosinophils and respond to mast cell-derived factor(s). *FEBS. Lett.* 1999; 459: 195-199.
- [138] Nagata K, Tanaka K, Ogawa K, kemmotsu K, Imai T, Yoshie O, Abe H, Tada K, Nakamura M, Sugamura K, Takano S. Selective expression of a novel molecule by human Th2 cells in vivo. *J. Immunol.* 1999; 162: 1278-1286.

- [139] Nakajima C, et al. Induction of the chemokine receptor CXCR3 on TCR-stimulated T cells: dependence on the release from persistent TCR-triggering and requirement for IFN-gamma stimulation. *Eur. J. Immunol.* 2002; 32: 1792-1801.
- [140] Nishikawa K, Sugiyama T, Kato M et al. A prospective evaluation of new rapid urease tests before and after eradication treatment of helicobacter pylori, in comparison with histology, culture and C-urea breath test. *Gastrointest. Endosc.* 2000; 51: 164.
- [141] Nogueira C, Figueiredo C, Carneiro F, et al. Helicobacter pylori genotypes may determine gastric histopathology. *Am. J. Pathol.* 2001; 158: 647.
- [142] Nomura AMY, Perez-Perez GI, Lee J, Stemmermann G and Blaser MJ. Relationship between H.pylori cagA status and risk of peptic ulcer disease. *Am. J. Epidemiol.* 2002; 155: 1054-1059.
- [143] Oberhuber G, et al. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 1999; 11: 1185-1194.
- [144] Ohkusa T, et al. Helicobacter pylori infection induces duodenitis and superficial duodenal ulcer in Mongolian gerbils. *Gut* 2003; 52: 797-803.
- [145] Ohtani N, Ohtani H, Nakayama T, Naganuma H, Sato E, Imai T, Nagura H, Yoshie O. Infiltration of CD8+ T cells containing RANTES/CCL5+ cytoplasmic granules in actively inflammatory lesions of human chronic gastritis. *Lab. Invest.* 2004; 84: 368-375.
- [146] Okazaki H, et al. Characterization of chemokine receptor expression and cytokine production in circulating CD4+ T cells from patients with atopic dermatitis: up-regulation of C-C Chemokine receptor 4 in atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy* 2002; 32: 1236-1242.
- [147] Ortega-Cava CF, Ishihara S, Rumi MA, et al. Strategic compartmentalization of toll-like receptor 4 in the mouse gut. *J. Immunol.* 2003; 170: 3977-3985.
- [148] Overbergh L, Valckx D, Waer M, Mathieu C. Quantification of murine cytokine mRNAs using real-time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine* 1999; 11: 305-312.
- [149] Owen RJ, Xerry J. Tracing clonality of Helicobacter pylori infecting family members from analysis of DNA sequences of three housekeeping genes (ureI, atpA and ahpC), deduced amino acid sequences, and pathogenicity-associated markers (cagA and vacA). *J. Med. Microbiol.* 2003; 52: 515-524.

- [150] Park SM, Kim JH, Hong YH, Jung HR, Park J, Kim JG. Expression of mucosal cytochemokine mRNAs in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Korean J. Intern. Med.* 2001; 16: 230-235.
- [151] Peck RM and Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat. Rev. Cancer* 2002; 2: 28-37.
- [152] Peek RM Jr, Thompson SA, Donahue JP, et al. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iceA*, that is associated with clinical outcome. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 1998; 110: 531.
- [153] Pounder RE, Ng D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1995; 9: 33.
- [154] Qin S, Rottman JB, Myers P, et al. The Chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J. Clin. Invest.* 1998; 101: 746-754.
- [155] Rabin RL, et al. Chemokine receptor responses on T cells are achieved through regulation of both receptor expression and signaling. *J. Immunol.* 1999; 162: 3840-3850.
- [156] Raja S, Luketich JD, Kelly LA, Ruff DW, Godfrey TE. Increased sensitivity of one-tube, quantitative RT-PCR. *Biotechniques* 2000; 29: 702.
- [157] Ramos-Payán R, Aguilar-Medina M, Estrada-Parra S, González-y-Merchand JA, Favila-Castillo L, Monroy-Ostria A, Estrada-Garcia CE. Quantification of cytokine gene expression using an economical real-time polymerase chain reaction method based on SYBR green I. *Scan. J. Immunol.* 2003; 57: 439-445.
- [158] Re F, Strominger JL. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 37692-37699.
- [159] Rerksuppaphol S, Hardiker W, Midolo P, Ward P. Antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori* isolates from children. *J. Paediatr. Child Health* 2003; 39: 332-335.
- [160] Riccardi VM, Rotter JI. Familial *Helicobacter* infection. Societal factors, human genetics and bacterial genetics. *Ann. Intern. Med.* 1994; 120: 1043.
- [161] Rieder G, Einsiedl W, Hatz RA, Stolte M, Enders GA and Walz A. Comparison of CXC chemokines ENA-78 and Interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Infect. Immun.* 2001; 69: 81-88.

- [162] Rossi D, Zlotnik A. The Biology of chemokines and their receptors. *Ann. Rev. Immunol.* 2000; 18: 217-242.
- [163] Rothenbacher D, Inceoglu J, Bode G, Brenner H. Acquisition of *Helicobacter pylori* infection in a high risk population occurs within the first two years of life. *J. Pediatr.* 2000; 136: 744-748.
- [164] Rothenbacher D, Schultze V, Jähnig P, Scharschmidt B, Brenner H. Evidence of a rapid decrease in prevalence of *Helicobacter pylori* infection in children of a high risk group living in Germany. *Eur. J. Pediatr.* 2004; 163(6): 339-340.
- [165] Rothenbacher D, Winkler M, Gonser T, Adler G, Brenner H. Role of infected parents in transmission of *Helicobacter pylori* to their children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2002; 21: 674-679.
- [166] Rösch W, Labenz J. *Helicobacter pylori* und Refluxkrankheit der Speiseröhre. *Deutsches Ärzteblatt* 2001; 31-32: 2029-2030.
- [167] Rüssmann H, Kempf VA, Koletzko S, Heesemann J, Autenrieth IB. Comparison of fluorescent in situ hybridisation and conventional culturing for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 304-308.
- [168] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.
- [169] Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-1354.
- [170] Sallusto F, Lenig DC, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1998; 187: 875.
- [171] Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. The Role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Ann. Rev. Immunol.* 2000; 18: 593-620.
- [172] Savary M, Miller G. L'oesophage. *Manuel et atlas d'endoscopie*. Soleure; Garsmann AB, 1977.

- [173] Sawai N, Kita M, Kodama T, Tanahashi T, Yamaoka Y, Tagawa Y, Iwakura Y and Imanishi J. Role of gamma interferon in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. *Infect. Immun.* 1999; 67: 279-285.
- [174] Schall TJ, Bacon KB. Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* 1994; 6: 865-873.
- [175] Schluger NW, Rom WN. Early responses to infection: chemokines as mediators of inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* 1997; 9: 504-508.
- [176] Schmauß B, Andrulis M, Endrich S, Lee SK, Josenhans C, Müller-Hermelink HK, Eck M. Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Exp. Immunol.* 2004; 136: 521-526.
- [177] Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 2004; 75: 163-189.
- [178] Seo JK, Ko JS, Choi KD. Serum ferritin and *Helicobacter pylori* infection in children: a sero-epidemiologic study in Korea. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2002; 17: 754-757.
- [179] Shi N, Walker A. Bacterial colonization and the development of intestinal defences. *Can. J. Gastroenterol.* 2004; 18: 493-500.
- [180] Shimizu T, Haruna H, Ohtsuka Y, Kaneko K, Gupta R and Yamashiro Y. Cytokines in the gastric mucosa of children with *Helicobacter pylori* infection. *Acta Paediatr.* 2004; 93: 322-326.
- [181] Shimoyama T, Everett SM, Dixon MF, Axon ATR, Crabtree JE. Chemokine mRNA expression in gastric mucosa is associated with *Helicobacter pylori* cagA positivity and severity of gastritis. *J. Clin. Pathol.* 1998; 51: 765-770.
- [182] Sitas F, Forman D, Yarnell JWG, Burr ML, Elwood PC, Padley S, Marks KJ. *Helicobacter pylori* infection rates in relation to age and social class in a population of Welsh men. *Gut* 1991; 32: 25-28.
- [183] Smoak BL, Kelley PW, Taylor DN. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infections in a cohort of U.S.Army recruits. *Am. J. Epidemiol.* 1994; 139: 513.
- [184] Smoot DT. How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage ? Direct mechanisms. *Gastroenterology* 1997; 113: 31-34.

- [185] Smythies LE, et al. Helicobacter pylori-induced mucosal inflammation is Th1 mediated and exacerbated in IL-4, but not IFN-gamma, gene-deficient mice. *J. Immunol.* 2000; 165: 1022-1029.
- [186] Sommer F, Faller G, Konturek P, et al. Antrum- and corpus mucosa-infiltrating CD4(+) lymphocytes in Helicobacter pylori gastritis display a Th1 phenotype. *Infect. Immun.* 1998; 66: 5543-5546.
- [187] Sommer F, Wilken H, Faller G, et al. Systemic Th1 immunization of mice against Helicobacter pylori infection with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants does not protect from infection but enhances gastritis. *Infect. Immunol.* 2004; 72: 1029-1035.
- [188] Song F, Matsuzaki G, Mitsuyama M, Nomoto K. Differential effects of viable and killed bacteria on IL-12 expression of macrophages. *J. Immunol.* 1996; 156: 2979-2984.
- [189] Steeg PS, Moore RN, Johnson HM, Oppenheim JJ. Regulation of murine macrophage Ia antigen expression by a lymphokine with immune interferon activity. *J. Exp. Med.* 1982; 156: 1780-1793.
- [190] Stordeur P, Poulin LF, Carciun L, Zhou L, Schandené L, de Lavareille A, Goriely S, Goldman M. Cytokine mRNA quantification by real-time PCR. *J. Immunol. Meth.* 2002; 259: 55-64.
- [191] 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; 10: 116-124.
- [192] Su B, Ceponis PJM, Lebel S, Huynh H and Sherman PM. Helicobacter pylori activates toll-like receptor 4 expression in gastrointestinal epithelial cells. *Infect. and Immun.* 2003; 71: 3496-3502.
- [193] Sugita M, Haney JL, Gemmill RM, Franklin WA. One-step duplex reverse transcription-polymerase chain reaction for quantitative assessment of RNA degradation. *Anal. Biochem.* 2001; 295: 113-116.
- [194] Sugiyama Y, Sugiyama K, Hirai Y, Akiyama F, Hasumi K. Microdissection is essential for gene expression profiling of clinically resected cancer tissues. *Am. J. Clin. Pathol.* 2002; 117: 109-116.

- [195] Swift GH, Peyton MJ, MacDonald RJ. Assessment of RNA quality by semi-quantitative RT-PCR of multiple regions of a long ubiquitous mRNA. *Biotechniques* 2000; 28: 524-531.
- [196] Tang HL, Cyster JG. Chemokine up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science* 1999; 284: 819-822.
- [197] Tomita T, Jackson AM, Hida N, Hayat M, Dixon MF, Shimoyama T, Axon AT, Robinson PA, Crabtree JE. Expression of interleukin-18, a Th1 cytokine, in human gastric mucosa is increased in *Helicobacter pylori* infection. *J. Infect. Dis.* 2001; 183: 620.
- [198] Torres J, Leal-Herrera Y, Perez-Perez G, et al. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *J. Infect. Dis.* 1998; 178: 1089.
- [199] Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M, Bustin SA, Orlando C. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal. Biochem.* 2002; 309: 293-300.
- [200] Uhlig HH, Tannapfel A, Mössner J, Jedwilyties S, Deutscher J, Müller DM, Kiess W, Richter T. Histopathological parameters of *Helicobacter pylori*-associated gastritis in children and adolescents: Comparison with Findings in adults. *Scand. J. Gastroenterol.* 2003; 7: 701-706.
- [201] van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, et al. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1998; 115: 58.
- [202] Vasselone T, Detmers PA. Toll receptors : a central element in innate immune responses. *Infect. Immun.* 2002; 70: 1033-1041.
- [203] Wadstrom T, Hirno S, Boren T. Biochemical aspects of *Helicobacter pylori* colonization of the human gastric mucosa. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1996; 10: 17.
- [204] Webb PM, Knight T, Greaves S, et al. Relation between infection with *Helicobacter pylori* and living conditions in childhood: Evidence for person to person transmission in early life. *Br. Med. J.* 1994; 308: 750.
- [205] Weeks DL, Eskandari S, Scott DR, Sachs G. A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* 2000; 287: 482.
- [206] Weeks DL, Gushansky G, Scott DR, Sachs G. Mechanism of proton gating of a urea channel. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 9944-9950.

- [207] Wever V, Kalach N. Helicobacter pylori infection in pediatrics. *Helicobacter* 2003; 8: 61-67.
- [208] Winter J, Jung CK, Shackel I, Williams PM. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal. Biochem.* 1999; 270: 41-49.
- [209] Yamamoto T, Kita M, Ohno T, Iwakura Y, Sekikawa K, Imanishi J. Role of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in Helicobacter pylori infection. *Microbiol. Immunol.* 2004; 48: 647-654.
- [210] Yamaoka Y, Kikuchi S, el-Zimaity HM, et al. Importance of Helicobacter pylori oipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. *Gastroenterology* 2002; 123: 424.
- [211] Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Tanahashi T, Kashima K, Imanishi J. Chemokines in the gastric mucosa in Helicobacter infection. *Gut* 1998; 42: 609-617.
- [212] Yin JL, Shackel NA, Zekry A, McGuinness PH, Richards C, van der Putten K, McCaughan GW, Eris JM, Bishop GA. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR green I. *Immunol. Cell Biol.* 2001; 79: 213-221.
- [213] Young HA, Hardy KJ. Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J. Leukoc. Biol.* 1995; 58: 373-381.
- [214] Young HA. Regulation of interferon-gamma gene expression. *J. Interferon Cytokine Res.* 1996; 16: 563-568.
- [215] Zheng PY and Jones NL. Helicobacter pylori strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and retaining TACO (coronin1) protein. *Cell. Microbiol.* 2003; 5: 25-40.
- [216] Zimaity HM, Graham DY, Al-Assi MT, Malaty H, Karttunen TJ, Graham DP, Huberman RM, Genta RM. Interobserver variation in the histopathologic assessment of Helicobacter pylori gastritis. *Hum. Pathol.* 1996; 27:35-41.

7.2. Abbildungsverzeichnis

| | |
|-----------------|--|
| Abbildung 1 | Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Helicobacter pylori</i> |
| Abbildung 2a/b | Grundzüge der Th1-/Th2-Immunantwort |
| Abbildung 3 | Fliessschema der RNA-Isolation aus Gewebe |
| Abbildung 4 | Amplifikationsprogramm am iCycler iQ |
| Abbildung 5 | PCR-Quantifikation |
| Abbildung 6 | PCR-Schmelzkurvenanalyse |
| Abbildung 7 | Gruppenübersicht aller Patienten |
| Abbildung 8 | CXCR3-Expression der Patientengruppen 1-3 |
| Abbildung 9 | IFN-gamma-Expression der Patientengruppen 1-3 |
| Abbildung 10 | IL-12-Expression der Patientengruppen 1-3 |
| Abbildung 11 | CCR4-Expression der Patientengruppen 1-3 |
| Abbildung 12 | CRTH2-Expression der Patientengruppen 1-3 |
| Abbildung 13 | IL-10-Expression der Patientengruppen 1-3 |
| Abbildung 14-15 | TLR2-/TLR4-Expression der Patientengruppen 1-3 |
| Abbildung 16-18 | Korrelation von TLR4 zu CXCR3, CCR4 und IFN-gamma |

7.3. Tabellenverzeichnis

| | |
|---------------|---|
| Tabelle 1 | PCR-Reaktionsschritte |
| Tabelle 2 | Diagnostische Befunde der Patientengruppe 1 |
| Tabelle 3 | Sydney-Klassifikation der Patientengruppe 1 |
| Tabelle 4 | Chronizität der Patienten A1-A15 |
| Tabelle 5 | Diagnostische Befunde der Patientengruppe 2 |
| Tabelle 6 | Sydney-Klassifikation der Patientengruppe 2 |
| Tabelle 7 | Diagnostische Befunde der Patientengruppe 3 |
| Tabelle 8 | Sydney-Klassifikation der Patientengruppe 3 |
| Tabelle 9 | CXCR3-Expression im Patientenvergleich |
| Tabelle 10 | IFN-gamma-Expression im Patientenvergleich |
| Tabelle 11 | IL-12-Expression im Patientenvergleich |
| Tabelle 12 | CCR4-Expression im Patientenvergleich |
| Tabelle 13 | CRTH2-Expression im Patientenvergleich |
| Tabelle 14 | IL-10-Expression im Patientenvergleich |
| Tabelle 15 | TLR2-/TLR4-Expression im Patientenvergleich |
| Tabelle 16 | Korrelation von TLR4 zu CXCR3, CCR4 und IFN-gamma |
| Tabelle 17-19 | Korrelation zwischen Expression und Alter |

7.4. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. S. Krauss-Etschmann für die Überlassung des Themas und für ihr kontinuierliches Engagement bei der Betreuung meiner Arbeit.

Bei Frau Prof. Dr. med. S. Koletzko möchte ich mich für ihre kollegiale Art der Betreuung meiner Doktorarbeit und für die Bereitstellung des Probenmaterials bedanken.

Dank an Dr. Christoph Weiler aus dem Pathologischen Institut der LMU für die geblindete Befundung der Biopsien

Herrn Prof. Dr. med. Dr. Reinhardt möchte ich für die Möglichkeit der Durchführung meiner Arbeit in den Laboratorien der Arbeitsgruppe „Pädiatrische Immunologie“ am Forschungszentrum Kubus des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität München danken.

Bei meinen Mitdoktoranden Christian Rebhan, Esther Sammler, Daniel Zecher, Dominik Hartl, Ines Lerner, Jakob Säckl, Silvia Hexamer, Christiane Kraus, Korinna Nadas, Florian Vogel, Anastasia Schneider und bei meinen Kollegen unserer Forschungsgruppe Christine Prell, Cornelia Dalibor und ganz besonders bei Gaby Heilig möchte ich mich für ihre Hilfestellungen im Labor bedanken.

Bei meinen Freunden Philipp Bode, Alexander Stage, Klaus Ketterle, Gerhard Grüter, Sven Hansen, Zeno Eder und Dr. med. Norbert Grüner möchte ich mich für deren Hilfe bei diversen Fragestellungen meiner Doktorarbeit und für deren Beistand auch während des Studiums bedanken.

Bei meiner Freundin Claudia, meiner Mutter, meinem Vater, meiner Schwester und meinen verstorbenen Großeltern möchte ich mich ganz besonders für ihren Beistand und ihre Fürsorge bedanken.

7.5. Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|---------------------|--------------------|
| Geburtsdatum | 29.11.1973 |
| Geburtsort | München |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |
| Konfession | römisch-katholisch |
| Familienstand | ledig |

Schul- und Berufsausbildung

| | |
|-----------|---|
| 1994 | Abitur am Gymnasium der Benediktiner Schäftlarn |
| 1996-1998 | Redaktionsvolontariat bei Meins Fernsehen für München und RTL München live |

Studium

| | |
|---------|---|
| 1998 | Immatrikulation an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) |
| 04/2000 | Ärztliche Vorprüfung |
| 04/2001 | 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| 04/2003 | 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| 04/2004 | 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |

Praktisches Jahr

| | |
|------------|---|
| 1. Tertial | Universitätsklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU |
| 2. Tertial | Medizinische Klinik II und III der Universitätsklinik Großhadern der LMU |
| 3. Tertial | Chirurgische Klinik des Kantonsspital St. Gallen |

Wissenschaftlicher Assistenzarzt

| | |
|--------------|---|
| Seit 12/2004 | Medizinische Klinik II der Universitätsklinik Großhadern der LMU |
|--------------|---|