

Aus der Klinik für Innere Medizin I
(Direktor: Prof. Dr. Stefan Schreiber)
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Analyse der Expression von antimikrobiellen Peptiden und deren Regulatoren
bei der akuten Appendizitis**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Lorin Aloj
aus Hassake (Syrien)

Kiel 2012

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Alexander Arlt

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Ehrhardt Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2013

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 24.10.2012

**gez.: Prof. Dr. med. Matthias Laudes
(Ausschussvorsitzender)**

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Appendix | 2 |
| 1.1.1 | Appendizitis | 2 |
| 1.2 | Antimikrobielle Peptide | 4 |
| 1.3 | Defensine | 5 |
| 1.3.1 | α -Defensine | 6 |
| 1.3.2 | β -Defensine | 7 |
| 1.4 | RNase 7 | 8 |
| 1.5 | Regulation der Defensinexpression | 8 |
| 1.6 | Fragestellung | 9 |
| 2 | Material und Methoden | 10 |
| 2.1 | Patientenkollektiv, Gewebeproben und Material | 10 |
| 2.1.1 | Gewebeproben | 10 |
| 2.1.2 | Chemikalien | 11 |
| 2.1.3 | Geräte | 12 |
| 2.1.4 | Kits | 12 |
| 2.1.5 | Enzyme | 13 |
| 2.1.6 | Nukleotide | 13 |
| 2.1.7 | Gele | 13 |
| 2.1.8 | Verbrauchsmaterialien | 13 |
| 2.1.9 | Puffer und Lösungen | 14 |
| 2.2 | Methoden | 15 |
| 2.2.1 | Aufbereitung der Gewebeproben | 15 |
| 2.2.2 | Quantifizierung der Gen-Expression mittels real-time PCR | 16 |
| 2.2.3 | Generierung externer Standards | 21 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.2.4 | TaqMan Low Density Arrays | 21 |
| 2.2.5 | Analyse der 16S rRNA – bakterielle Beteiligung | 21 |
| 2.2.6 | Statistische Analysen | 23 |
| 3 | Ergebnisse | 24 |
| 3.1 | Gen-Expression der α -Defensine | 24 |
| 3.1.1 | Die Gen-Expression von HNP1-3 | 24 |
| 3.1.2 | Die Gen-Expression von HD5 | 24 |
| 3.1.3 | Die Gen-Expression von HD6 | 25 |
| 3.2 | Gen-Expression der β -Defensine | 26 |
| 3.2.1 | Die Gen-Expression von hBD-1 | 26 |
| 3.2.2 | Die Gen-Expression von hBD-2 und hBD-3 | 27 |
| 3.3 | Messung der Gen-Expression von RNase 7 | 27 |
| 3.4 | Gen-Expression der Zytokine | 28 |
| 3.5 | Gen-Expression der Toll-like Rezeptoren 1-10 | 29 |
| 3.6 | TaqMan Low Density Array | 31 |
| 3.7 | 16S rRNA-Analyse | 32 |
| 4 | Diskussion | 34 |
| 4.1 | Expression der antimikrobiellen Peptide in der Appendizitis | 34 |
| 4.1.1 | Alpha-Defensine | 34 |
| 4.1.2 | Beta-Defensine | 35 |
| 4.1.3 | RNase-7 | 36 |
| 4.2 | Expression der potentiellen Regulatoren der AMP-Antwort | 37 |
| 4.2.1 | Zytokine | 37 |
| 4.2.2 | Toll-like Rezeptoren | 38 |
| 4.2.3 | NOD2 | 38 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.3 | Erfassung der Mikrobiota während der Appendizitis | 39 |
| 5 | Zusammenfassung | 41 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 43 |
| 7 | Danksagung | 51 |
| 8 | Lebenslauf | 52 |
| 9 | Anhang | 53 |
| 9.1 | Erklärung Ethik | 53 |
| 9.2 | Erklärung Doktorarbeit | 53 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung der β -Defensine | 6 |
| Abbildung 2: Standardverdünnungsreihe von hBD-3 | 17 |
| Abbildung 3: Schmelzkurve von hBD-3 | 18 |
| Abbildung 4: Expression der α -Defensine | 25 |
| Abbildung 5: Expression der β -Defensine | 26 |
| Abbildung 6: RNase 7-Expression..... | 27 |
| Abbildung 7: Zytokin-Expression | 28 |
| Abbildung 8: Expression der TLR-1-10 | 30 |
| Abbildung 9: TaqMan Low Density Array | 31 |
| Abbildung 10: DGGE Analyse der 16S rRNA..... | 32 |
| Abbildung 11: 16S rRNA Analyse..... | 33 |

Vorbemerkung

Teile dieser Arbeit wurden bei Digestive Disease Week 2012 („Amerikanischer Gastroenterologen Jahreskongress“) als folgender Abstract eingereicht:

„Acute appendicitis is characterized by increased bacterial diversity and expression of components of the innate and adaptive immune system“

Arlt, Alexander; Ilves, Imre; **Aloji, Lorin**; Miettinen, Pekka; Paajanen, Hannu; Brunke, Gabriele; Kiehne, Karlheinz; Haesler, Robert; Ellrichmann, Mark, Schreiber, Stefan; Rosenstiel, Philip C.; Ott, Stephan J.; Herzig, Karl-Heinz

1 Einleitung

Der Gastrointestinaltrakt als Verdauungssystem des Körpers versorgt den Gesamtorganismus mit den notwendigen Nährstoffen, stellt aber auch die größte Oberfläche für Wechselwirkungen zwischen dem intestinalen Milieu und dem Organismus dar. Er ist einer Vielzahl von belastenden Faktoren ausgesetzt, wie mechanischer Belastung, Veränderung des pH-Wertes oder der Osmolarität, aber auch verschiedenen Mikroorganismen im Lumen. Die Normalflora des menschlichen Gastrointestinaltraktes zeichnet sich durch die Beherbergung von über 500 verschiedenen Mikroorganismen aus, die sich in den einzelnen Darmabschnitten in Bezug auf Besiedlungsdichte und Keimspektrum unterschiedlich verteilen (Dominguez-Bello *et al.*, 2011; Kubler *et al.*, 2006; Otte *et al.*, 2003; Wehkamp *et al.*, 2005). In einem gesunden Organismus zeigt die natürliche Darmflora positive Effekte, so helfen viele dieser Mikroorganismen bei der Digestion von Nahrungsbestandteilen, aber auch bei der Abwehr von Pathogenen scheinen sie wichtig zu sein. Es herrscht eine Konkurrenz um Nährstoffe und Besiedlungsräume zwischen der physiologischen Besiedlung des Darmes mit kommensalen Keimen und pathogenen Erregern. Die potenzielle Gefährlichkeit einiger Spezies zeigt sich z.B. im Rahmen häufiger Antibiotikatherapien, wodurch es zu einer Zerstörung dieser kommensalen Flora kommt und das vermehrte Wachstum der pathogenen Keime Entzündungen hervorruft (Preidis and Versalovic, 2009; Ringel and Carroll, 2009; Round and Mazmanian, 2009; Shanahan, 2009). Eine Barriere zwischen dem Inhalt des Darmlumens und dem Innern des Körpers bildet die Mukosa des Gastrointestinaltraktes. Sie weist zwar bezüglich des Epithels und der räumlichen Gestalt die größten regionalen Unterschiede auf, erfüllt aber neben ihren regional spezifischen Aufgaben überall die Funktion einer Diffusionsbarriere, um eine bakterielle Invasion und somit eine Entzündung der Submukosa zu verhindern. Es handelt sich hierbei nicht um eine rein physikalische Barrierefunktion, sondern einer aktiveren Rolle des Mukosaepithels innerhalb der Abwehrfunktion (Wehkamp *et al.*, 2005; Wehkamp *et al.*, 2007a). So kontrolliert das Mukosaepithel aktiv durch Synthese und Freisetzung mikrobizid wirkender Faktoren, der sog. antimikrobiellen Peptide, die Besiedelung durch Mikroorganismen und verhindert deren Invasion. Einige dieser antimikrobiellen Peptide werden stetig freigesetzt, während andere im

Rahmen von Entzündungsreaktionen durch Zytokine und bakterielle Bestandteile induziert werden (Wehkamp *et al.*, 2005; Wehkamp *et al.*, 2007a). Kommt es zu einer Störung dieser sogenannten „innate Immunity“ oder auch „angeborenen Abwehr“ sind Infektionen und entzündliche Erkrankungen des Darms die Folge.

1.1 Appendix

Als verkleinerter Teil des Kolon entspringt der Appendix ca. 2-3 cm distal der Bauhin-Klappe und bildet den Anhang des Caecum. Er besitzt als intraperitoneales Organ mit einer Länge von 7-8 cm und einer Dicke von 0,5-1 cm ein eigenes Aufhängeband (Mesoappendix) und ist somit frei beweglich. Die Mukosa des Appendix entspricht der kolorektalen Schleimhaut. Im Lumen des Appendix befinden sich oft Reste von Darminhalt, sowie abgestorbene Epithel- und Abwehrzellen. Die physiologische Bedeutung ist immer noch umstritten. Dessen Funktion nach ist der Appendix ein lymphatisches Organ. In seiner Wand liegen zahlreiche Lymphfollikel. Mit diesem immunkompetenten Gewebe wird auch er in die Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase des Organismus eingebunden.

1.1.1 Appendizitis

Die akute Appendizitis ist in jüngerem Patientenalter (Häufigkeitsgipfel zwischen dem 10. und 30. Lebensjahr) weltweit die mit Abstand häufigste Entzündung im Bereich des Abdomens und somit eines der häufigsten Ursachen für Abdominalschmerz. Während mildere Verläufe ohne therapeutische Behandlung rückläufig sind, erfordern die meisten Fälle der akuten Appendizitis die operative Entfernung des entzündlichen Appendix mittels Laparoskopie oder Laparotomie (Green, 2008; Simpson *et al.*, 2008). Unbehandelte oder zu spät therapierte Fälle einer Appendizitis weisen eine hohe Letalität auf. Dies beruht hauptsächlich auf Komplikationen wie Perforation mit konsekutiver Peritonitis und Schock. Die Pathophysiologie der Appendizitis ist noch weitestgehend unbekannt. Charakteristisch ist die Entzündung des Appendix. Da als Ursache die Blockade des Appendixlumens verantwortlich gemacht wird, wird für die akute Appendizitis eine bakterielle Ursache angenommen (Lamps, 2004). Die Blockade kann bedingt sein durch Verdickung der Appendixmukosa oder durch Darminhalt, der aus dem Caecum in den Appendix tritt, worauf das lymphatische Gewebe des Appendix aktiviert wird, anschwillt und die Blockade des Lumens verursacht. Ob die Appendizitis eine lymphatische

Gewebereaktion auf enterische Pathogene ist, ist noch umstritten. Verschiedene mikrobiologische Spezies wurden im Bereich des entzündlich veränderten Appendix nachgewiesen, wobei ein spezifischer „Appendizitiskeim“ bislang jedoch nicht isoliert werden konnte (Lin *et al.*, 2006). Neueste Studien beschreiben gemischt bakterielle Infiltrate im entzündlich veränderten Appendix, in denen sowohl Aerobier als auch Anaerobier gefunden wurden, so wie *Bacteroides*, *Escheria coli*, Streptokokken, Enterokokken und *Campylobacter jejuni*. Die genaue mikrobiologische Zusammensetzung bleibt jedoch weitgehend unbekannt. Interessant ist, dass im Vergleich zum gesunden Kolon die relative Häufigkeit von Clostridien, Enterokokken, *Entereobacter cloacae*, Laktobazillen, Eubakterien, *Bacteroides vulgatus* und *bacteroides distasonis* im entzündlichen Appendix geringer ist. Eine kürzlich erschienene Arbeit konnte eine zentrale Rolle von *Fusobacterium nucleatum/necrophorum* in der Appendizitis postulieren (Swidsinski *et al.*, 2011), wobei die Bestätigung dieser Ergebnisse noch ausstehen. Die Appendizitis zeigt außerdem neutrophile, monozytäre und lymphozytäre Infiltrate, die im gesunden Appendix nicht vorhanden sind. Obwohl eine schnelle Progression dieser zellulären Infiltration zu beobachten ist, ist die zeitliche Abfolge dieser Entwicklung noch unbekannt (Lamps, 2004). Auch ist nachgewiesen, dass die Produktion von Zytokinen wie IL-1 β und IL-8 bei akuter Appendizitis steigt (Shiohara *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2005). Man vermutet, dass bakterielles Lipopolysaccharid eine zentrale Rolle in der Entwicklung der Appendizitis und der daraus folgenden generalisierten systemischen antiinflammatorischen Antwort einnimmt, was bei der Mehrheit der Patienten mit klinisch charakteristischen Zeichen einer Appendizitis beobachtet wurde (Peterfi *et al.*, 2006; Rivera-Chavez *et al.*, 2003). Zudem wurde die Rolle des Appendix in der immunologischen Funktion der menschlichen Mukosa insofern hervorgehoben, als dass die Appendektomie auf dem Boden intraabdominellen Entzündungsgeschehens protektiv gegen die Entstehung von Colitis ulcerosa und potenziell auch gegen die Entstehung von M. Crohn wirkt (Radford-Smith, 2008). Insofern scheint der Appendix auch eine wichtige Rolle in der Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen zu spielen (Radford-Smith, 2008; Watson Ng *et al.*, 2007).

Ob und wie weit die angeborene Abwehr und hier vor allem die Antimikrobiellen Peptide, die bei den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen höchst relevant zu sein scheinen (Wehkamp *et al.*, 2008; Wehkamp and Stange, 2008; Wehkamp *et al.*,

2009), in der Pathogenese der Appendizitis beteiligt sind, ist bisher unbekannt und soll daher Gegenstand dieser Arbeit sein.

1.2 Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide (AMPs) sind kleine Peptide, die von Epithelzellen sowie von Zellen des Immunsystems gebildet werden und Mikroorganismen abtöten oder deren Wachstum hemmen. Mehr als 100 Peptide mit antimikrobieller Aktivität konnten bisher in vielen Spezies identifiziert werden (Peters *et al.*, 2011). Im menschlichen Körper konnten diese „körpereigenen Antibiotika“ in vielen Geweben nachgewiesen werden, die einer großen Anzahl von Mikroorganismen ausgesetzt sind, wie z.B. die Haut, die Mukosa des Gastrointestinaltraktes oder das respiratorische Epithel. Da sie als Peptide von Zellen gebildet werden und somit im genetischen Code festgelegt sind, werden sie dem angeborenen unspezifischen Immunsystem zugerechnet (Yang *et al.*, 2007).

Im Gegensatz zum erworbenen spezifischen Immunsystem, das einer komplizierten Interaktion von Immunzellen bedarf, um eine effektive und erregerspezifische Immunantwort auszulösen und somit eine gewisse Vorlaufzeit benötigt, um maximale Effektivität zu erreichen, umfasst das angeborene Immunsystem physikalische, chemische und mikrobiologische Barrieren, aber auch zelluläre und molekulare Faktoren wie neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, das Komplementsystem, Zytokine und Akut-Phase-Proteine, die eine sofortige Immunantwort gewährleisten. Das angeborene Immunsystem arbeitet zwar unspezifisch, ist aber stets aktiv und sofort induzierbar. Die einzelnen Faktoren der angeborenen Immunität arbeiten effektiv zusammen und können sich gegenseitig verstärken (Cario, 2008). Bezüglich der hohen Bakteriendichte des Verdauungstraktes und der kurzen Verdopplungszeit der Bakterien ist das erworbene Immunsystem nicht schnell und effektiv genug, auf eine eventuelle Infektion reagieren zu können. Deshalb wird den Mechanismen des angeborenen Immunsystems immer mehr Bedeutung zugesprochen.

Während man früher eher von einer rein physikalisch statischen Barriere zwischen dem Innern des Gastrointestinaltraktes und dem Organismus ausgegangen ist, geht man heute von einer aktiveren Rolle des Epithels in diesem Abwehrsystem aus (Cario, 2008). Entscheidende Bedeutung kommt der Sekretion antimikrobieller

Peptide hierbei zu (Peters *et al.*, 2011). Sie bilden die erste Verteidigungsbarriere gegen Mikroorganismen, bis die erworbene Immunität übernehmen kann.

Antimikrobielle Peptide werden als Polypeptide mit weniger als 100 Aminosäuren definiert (Peters *et al.*, 2011). Die meisten AMPs besitzen amphiphile Charakter. Durch Wechselwirkung des kationischen Teils der Peptide mit den anionischen Phospholipidgruppen der Prokaryontenmembran kommt es durch Porenbildung in der Membran zur Zelllyse der Bakterien. Die antimikrobielle Aktivität der einzelnen Peptide liegt im mikromolaren Bereich. Ihr Wirkspektrum umfasst Bakterien, Pilze, einige Parasiten und Viren, wobei zwischen den einzelnen AMPs individuelle Unterschiede in der Wirksamkeit bestehen. Ihre Expression ist in der Regel induzierbar, es sind aber auch konstant exprimierte AMPs bekannt (Wehkamp *et al.*, 2005).

Aufgrund der unterschiedlichen chemischen Struktur der Peptide unterliegen diese einer strengen Klassifizierung (Boman, 1991; Strominger, 2009). Die humanen AMPs werden in zwei große Familien unterteilt, die Defensine und die Cathelicidine (Wehkamp *et al.*, 2007a). Cathelicidine sind lineare, α -helikale Peptide ohne Cysteinreste. Beim Menschen konnten bisher nur das Cathelicidin LL-37/hCAP-18 aus myeloiden Zellen identifiziert werden (Wehkamp *et al.*, 2007a). Antimikrobielle Peptide werden als Defensine bezeichnet. Sie weisen eine flache, dimere β -Faltblatt-Struktur auf und werden hauptsächlich von epithelialen Geweben und von Leukozyten exprimiert (Wehkamp *et al.*, 2007a). Angeregt durch Zytokine, kann deren Produktion im Rahmen von Entzündungsprozessen schnell hoch reguliert werden und Erreger so zunächst ohne Beteiligung von Lymphozyten abgewehrt werden.

1.3 Defensine

Die humanen Defensine sind in einem Gen-Cluster auf dem Chromosom 8p23 kodiert (Hollox *et al.*, 2008). Sie bestehen aus 28-44 Aminosäuren und haben ein Molekulargewicht von 3,5-4,5 kDa. Charakteristisch für alle Defensine sind sechs konservierte Cysteinreste, die untereinander drei Disulfidbrücken bilden, die die Peptide stabilisieren, ihnen die typische räumliche Struktur verleihen und die Resistenz gegenüber Proteolyse erhöhen. Aufgrund der Anordnung der gebildeten Disulfidbrücken unterteilt man die Defensine in zwei Gruppen, α - und β -Defensine (Kubler *et al.*, 2006; Wehkamp *et al.*, 2007a).

α -Defensine bilden Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen: C1-C6, C2-C4, C3-C5 und β -Defensine zwischen den Cysteinen C1-C5, C2-C4, C3-C6 (Pazgier *et al.*, 2006).

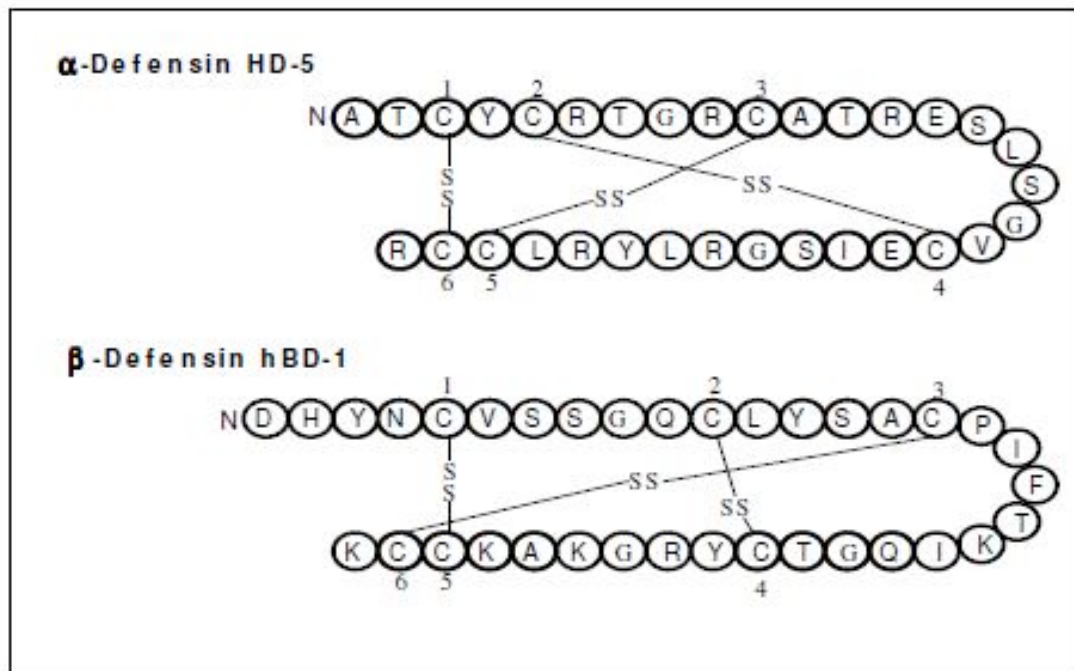


Abbildung 1: Schematische Darstellung der β -Defensine

Intramolekulare Disulfidbrückenbildung (SS) zwischen konservierten Cystein-Resten (C) am Beispiel von HD5 (α -Defensin) und hBD-1 (β -Defensin (aus (Otte *et al.*, 2003))).

Zur Gruppe der α -Defensine gehören die *Humanen Neutrophilen Peptide* (HNP 1-4) sowie die *Humanen Defensine* (HD) 5 und 6. Die β -Defensine werden als *humane Beta Defensine* (hBD) bezeichnet. Bisher sind vier β -Defensine: hBD-1-4 beschrieben und charakterisiert worden (Otte *et al.*, 2003).

1.3.1 α -Defensine

Beim Menschen wurden bisher sechs α -Defensine identifiziert, die *Humanen Neutrophilen Peptide* (HNP) 1-4 und die *Humanen Defensine* (HD) 5 und 6. Die α -Defensine werden als 93-100 Aminosäuren lange Pre-Peptide synthetisiert. Diese werden von einer Signalpeptidase abgespalten und das Pro-Peptid (41-51 Aminosäuren) in den Granulozyten und den Panethzellen durch proteolytische Enzyme weiter prozessiert. Das funktionale Peptid wird anschließend in Granula verpackt und gespeichert (Beckloff and Diamond, 2008). Die HNP 1-4 wurden als erste untersuchte Defensine beim Menschen aus neutrophilen Granulozyten isoliert.

Sie stellen etwa 5% des Gesamtproteingehalts der Neutrophilen dar (Ganz *et al.*, 1985) und sind somit neben oxidativ wirkenden Substanzen wie Sauerstoffradikale oder Wasserstoffperoxid Effektorproteine der neutrophilen Granulozyten und sind für einen Großteil der Sauerstoff-abhängigen Abtötung von phagozytierten Mikroorganismen verantwortlich. Die antimikrobielle Aktivität liegt in Konzentrationen von wenigen Mikromol gegen ein weites Spektrum von grampositiven und gramnegativen Bakterien, sowie umhüllten Viren (Wehkamp *et al.*, 2005).

HD5 und HD6 wurden aus Panethzellen in der Basis der Krypten des Dünndarms isoliert (Jones and Bevins, 1992; Jones and Bevins, 1993). Sie werden als Pro-Peptide in sekretorischen Vesikeln der Panethzellen oder den Granulozyten des Dünndarmepithels gelagert. Nach Stimulation durch Mikroorganismen (Beckloff and Diamond, 2008) erfolgen die Prozessierungsvorgänge über Spaltung durch proteolytische Enzyme.

1.3.2 β -Defensine

Beim Menschen wurden bisher vier β -Defensine identifiziert. Im Gegensatz zu den α -Defensinen besitzen diese keine Pro-Region. Die Regulation ihrer Expression erfolgt allein auf der Basis der Transkription (Beckloff and Diamond, 2008).

HBD-1 wird ubiquitär exprimiert und in vitro Versuche zeigten gute Wirksamkeit gegen gramnegative Bakterien, aber nicht gegenüber grampositiven Bakterien. Die Expression von hBD-1 wird in der Regel als konstitutiv beschrieben, das heißt nicht induzierbar durch Zytokine oder mikrobielle Stimuli, jedoch konstant auf sehr hohem Expressionsniveau produziert (Schneider *et al.*, 2005).

Das zweite menschliche β -Defensin, hBD-2, wurde 1997 von Harder *et al.* aus Hautschuppen von Psoriasis-Patienten isoliert. Es besitzt hohe antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber gramnegativen Bakterien, wie *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli* aber auch Hefen, wie *Candida albicans*. Gegen grampositive Bakterien wie *Staphylococcus aureus* wurden nur bakterostatische Effekte beobachtet und dies erst in höheren Konzentrationen (Schneider *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu hBD-1 ist die basale Expression von hBD-2 geringer. Dafür kann seine Expression durch Entzündungsfaktoren oder durch Mikroorganismen deutlich gesteigert werden. Zudem wirkt es chemotaktisch auf T-Zellen und dendritische Zellen (Schneider *et al.*, 2005).

HBD-3 wurde erstmals ebenfalls aus Hautschuppen von Psoriasis-Patienten isoliert (Harder und Schroder, 2005b). Auch hBD-3 kann durch mikrobielle Stimul oder Entzündungsfaktoren induziert werden, wobei es in seinem Funktions- und Wirkungsprinzip entscheidende Unterschiede aufweist. Es besitzt nicht nur antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber gramnegativen Bakterien und Pilzen wie *Candida albicans*, sondern auch gegenüber grampositiven Bakterien wie *Staphylococcus aureus*. Auch weist es eine Unempfindlichkeit gegenüber hohen Salzkonzentrationen auf, während hBD-1 seine antimikrobielle Aktivität bei hohen Salzkonzentrationen verliert (Schneider *et al.*, 2005). Des Weiteren wird hBD-3 auch in nicht-epithelialen Geweben wie dem Herz- und dem Skelettmuskel exprimiert und es induziert die Migration von Monozyten, aber nicht von neutrophilen Granulozyten (Schneider *et al.*, 2005).

Das bisher letzte humane β -Defensin, hBD-4, zeigt nur 20-25%ige Sequenzhomologie zu den restlichen humanen β -Defensinen. Seine höchste Organexpression findet sich im Hoden und im Magen (Antrum) und kann ebenfalls durch Bakterien und Entzündungsfaktoren induziert werden (Schneider *et al.*, 2005).

1.4 RNase 7

RNase 7 ist eine Ribonuklease und gehört nicht zur Familie der Defensine. Harder und Schröder beschreiben RNase 7 als ein Peptid, das als Ribonuklease sowohl enzymatische Aktivität besitzt und Nukleinsäuren verdaut, als auch eine breite antimikrobielle Wirkung gegen verschiedene fakultativ pathogene Bakterien wie z.B. *S.aureus*, *P.aeruginosa* und *E.coli* sowie gegen die Hefe *C.albicans* zeigt. RNase 7 wurde nicht nur in der Haut, sondern auch im Respirationstrakt und Urogenitaltrakt nachgewiesen (Harder und Schroder, 2002; Schroder und Harder, 2006). Nur sehr geringe Konzentrationen sind im Dünndarm und Kolon gefunden worden. RNase 7 wird kontinuierlich auf einem Basisniveau in der gesunden Haut exprimiert. Inflammatorische Zytokine wie $\text{INF-}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{TNF}\alpha$, sowie Oberflächenproteine von Bakterien können die Expression von RNase 7 induzieren.

1.5 Regulation der Defensinexpression

Pathogene besitzen auf ihrer Oberfläche konservierte Strukturen, sog. PAMPs (pathogen-associated molecular pattern), wie z.B. das hochpotente Toxin Lipopolysaccharid in der äußeren Membran grampositiver Bakterien. Die Erkennung

dieser PAMPs ist die Domäne des angeborenen Immunsystems. Durch Bindung an spezielle Erkennungsrezeptoren, den sog. PRRs (pattern recognition receptor) wird die Infiltration der Epithelien durch Pathogene detektiert. PRRs werden hauptsächlich von dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen exprimiert. Sie sind in der Keimbahn codiert. Wichtige PRRs sind die Toll-like Rezeptoren (TLRs). Diese sind Zellmembran-assoziierte oder intrazelluläre Rezeptoren. Bisher wurden beim Menschen 10 verschiedene TLRs (TLR-1-10) identifiziert, die alle von spezifischen Liganden gebunden werden (Casanova *et al.*, 2011). Nach der Erkennung bzw. Bindung von PAMPs aktivieren die TLRs intrazelluläre Signalwege, die in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren resultieren und so die Produktion inflammatorischer Zytokine und Chemokine, wie TNF α , IL-1 β , IL-6 und IL-12 induzieren. Auf diesem Weg geschieht in der Regel auch die Regulation der Expression der induzierbaren antimikrobiellen Peptide.

1.6 Fragestellung

Wie bereits geschildert, sind die pathophysiologischen Vorgänge im Rahmen der akuten Appendizitis weitestgehend ungeklärt.

Es sollten daher in dieser Arbeit die Expression der antimikrobiellen Peptide und ihrer Regulatoren im Rahmen der epithelialen Abwehrmechanismen des Appendix untersucht werden, um eine mögliche pathophysiologische Funktion zu verifizieren.

Hierzu sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Expressionsanalyse der antimikrobiellen Peptide in der Appendix und während einer akuten Appendizitis
2. Analyse der Expression von Regulatoren der AMP-Expression im Rahmen der Appendizitis
3. Erfassung der Veränderungen der Mikrobiota während der Appendizitis

2 Material und Methoden

Die verwendeten Nukleotide, Enzyme, Chemikalien, Materialien und Geräte sind im Anhang aufgeführt ebenso die Zusammensetzungen von Lösungen und Gelen.

2.1 Patientenkollektiv, Gewebeproben und Material

2.1.1 Gewebeproben

Nach schriftlicher Einverständniserklärung über den Zweck der Gewebeentnahme wurden an dem Universitätsklinikum von Kuopio, Finnland die Gewebeproben im Rahmen operativer Eingriffe (Appendektomie) gewonnen und standen über eine Kooperation mit Herrn Prof. Karl-Heinz Herzig zur Verfügung. Neben diesen Gewebeproben wurden aus der bestehenden Sammlung des Institutes für Pathologie, UKSH Kiel Kryoschnitte von normalem und entzündlich verändertem Appendix für die Immunhistochemien verwendet. Die Probeentnahme und Gewebeuntersuchung wurde von der Ethikkommission der Universität Kiel genehmigt (Code AZ.: A158/01).

Insgesamt wurden 38 PatientInnen operiert. Die 14 PatientInnen der Kontrollgruppe hatten alle postoperativ einen Normalbefund. Bei einer Altersspanne von 19-69 Jahren lag das mittlere Alter bei 43 Jahren. 24 PatientInnen in einer Altersspanne von 18-63 Jahren (im Mittel 31 Jahre) wiesen einen entzündlich veränderten Appendix auf.

Tabelle 1: Verwendete Gewebe (MW: Mittelwert)

| | gesundes Gewebe | Appendizitis |
|-----------------|------------------------|---------------------|
| Anzahl | 14 | 24 |
| Alter | 19–69 Jahre | 18–63 Jahre |
| MW Alter | 43 Jahre | 31 Jahre |

Die Gewebeproben wurden sofort nach der Entnahme für den Transport ins Labor in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in diesem bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Für immunhistochemische Untersuchungen wurden Kryoschnitte des Institutes für Pathologie, UKSH Kiel von Gewebeproben der Kontrollgruppe und von verändertem Gewebe verwendet.

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 2: Chemikalien

| Produkt | Hersteller |
|---------------------------------------|--|
| β- Mercaptoethanol | Sigma, Dreisenhofen, D |
| Aceton | Merck, Darmstadt, D |
| Agarose | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Antikörperdiluent-Diluent | Dako Cytomation GmbH, Hamburg, D |
| Ammoniumperoxodisulfat (AMPS) 10% | Merck, Darmstadt, D |
| Aquatex | Merck, Darmstadt, D |
| Bromphenolblau | Merck, Darmstadt, D |
| Blockserum "Normalserum" | Dako Cytomation GmbH, Hamburg, D Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |
| Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP's) | Dako Cytomation GmbH, Hamburg, D |
| Diaminobenzidin (DAB) | Dako Cytomation GmbH, Hamburg, D |
| Diethylpyrocarbonat (DEPC) | Sigma, Dreisenhofen, D |
| Ethanol | Merck, Darmstadt, D |
| Ethylenediaminetetraaceticacid (EDTA) | Merck, Darmstadt, D |
| Ethidiumbromid | Sigma, Dreisenhofen, D |
| Glycerol | Merck, Darmstadt, D |
| Hämatoxylin III nach Gill | Merck, Darmstadt, D |
| Kanamycin | Boehringer, Mannheim, D |
| LB-Flüssigmedium | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Lysis-Puffer | Qiagen, Hilden, D |
| Magnesiumchlorid | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Methanol | Merck, Darmstadt, D |
| NB-Agar | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Polyacrylamid | Sigma, Dreisenhofen, D |
| S.O.C. Medium Ultrapur | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Streptavidin-Komplex | Dako Cytomation GmbH, Hamburg, D |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Merck, Darmstadt, D |
| Tissue Tech | Miles Scientific, USA |
| Top 10 E.coli | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Tris-Base | Merck, Darmstadt, D |
| Tris-HCl | Merck, Darmstadt, D |
| Wasserstoffperoxid | Merck, Darmstadt, D |
| Xylencyanol | Merck, Darmstadt, D |

2.1.3 Geräte

Tabelle 3: Geräte

| Produkt | Name | Hersteller |
|----------------------------------|------------------------------------|---|
| Biofuge | fresco | Hereus |
| Fluoreszenz Temperatur Cycler | LightCycler | Roche, Mannheim, D |
| Gelkammer horizontal | Horizon | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Gelkammer vertikal | Gelkammer vertikal | Biometra, Göttingen, D |
| Kühlschrank - 80 °C | Kyrosave | Schröder GmbH, Hamburg, D |
| Kühlschrank - 20 °C | Premium | Liebherr GmbH, Biberbach, D |
| Lichtmikroskop | Axioplan | Zeiss, Jena, D |
| Microtom | Microm HM 560 | Microm International GmbH, Volketswil, CH |
| Netzgerät für Elektrophoresen | 3000 Xi | BioRad, Hercules, CA, USA |
| Photometer | BioPhotometer | Eppendorf, Hamburg, D |
| Pipetten (1, 10, 100 µl) | Eppendorf | Eppendorf, Hamburg, D |
| Sequenzierer | ALA Express | Pharmacia, Uppsala, S |
| Sofortbildkamera | Camag Reprostar II | Polaroid, Cambridge, MA, USA |
| Thermocycler | Gene Amp PCR System 2400 | Perkin Elmer, Überlingen, D |
| Thermomixer | 5436 | Eppendorf, Hamburg, D |
| Thermozentrifuge | 5402 | Eppendorf, Hamburg, D |
| Ultraturrax | T 25 | Janke und Kunkel, D |
| UV-Lampe | high performance transluminator | Ultraviolet products, CA, USA |
| Wärmebad | Typ 1002 | GFL, Burgwedel, D |
| Zentrifuge | 5415C | Eppendorf, Hamburg, D |

2.1.4 Kits

Tabelle 4: Kits

| Produkt | Hersteller |
|------------------------------------|----------------------------------|
| LightCycler –Fast Start DNA Master | Roche, Mannheim, D |
| SYBR Green mix | |
| Miniprep Kit | Qiagen, Hilden, D |
| QuiaexII Kit | Qiagen, Hilden, D |
| RNeasy Mini Kit | Qiagen, Hilden, D |
| StreptABComplex/HRP | Dako Cytomation GmbH, Hamburg, D |
| You-Prime First Strand Beads | Pharmacia Biotech, Freiburg, D |

| | |
|-----------------------------|--------------------------|
| Zero Blunt Topo Cloning Kit | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Taq DNA Polymerase | Invitrogen, Karlsruhe, D |

2.1.5 Enzyme

Tabelle 5: Enzyme

| Produkt | Hersteller |
|-----------------------------------|--------------------------|
| Desoxiribonuklease I | Qiagen, Hilden D |
| Proof reading enzyme | Roche |
| Restriktionsenzyme (Hint3) | Boehringer, Mannheim, D |
| PCR-Blunt-II-Topo Vektor (3519bp) | Invitrogen, Karlsruhe, D |

2.1.6 Nukleotide

Tabelle 6: Nukleotide

| Produkt | Hersteller |
|-------------------|-----------------------------|
| DNA-Leiter 100 bp | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Oligo-dT Primer | Promega, Madison, WI, USA |
| Primer | Sigma-Genosys, Steinheim, D |
| Puc A, Puc B | Invitrogen, Karlsruhe, D |

2.1.7 Gele

Tabelle 7: Gele

| Bestandteile | Menge |
|---------------------------|--------------------------|
| Agarose | 1,7 g |
| TAE-Puffer 1 x | 100 ml |
| Produkt | Hersteller |
| Agarosegel Ultrapur 8 % | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Agarosegel Ultrapur 1,7 % | Invitrogen, Karlsruhe, D |

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien

| Produkt | Hersteller |
|------------------------------|------------------------------|
| LB-Agarplatten | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Objektträger SuperFrost plus | Menzel GmbH, Braunschweig, D |
| Pipettenspitzen | Eppendorf, Hamburg, D |
| Polaroid Filme | Kodak, Köln, D |
| Probengefäße (Tubes, 1,5 ml) | Eppendorf, Hamburg, D |
| Probengefäße (Tubes 50 ml) | Sarstedt, Nürnberg, D |

2.1.9 Puffer und Lösungen

Tabelle 9: Puffer und Lösungen

| Puffer | Bestandteile | Menge |
|--|---|--|
| cDNA-Auftragspuffer | Glycerol (50%tig) Bromphenolblau (100mg/10ml) Xylencyanol (100mg/10ml) H ₂ O | 50 ml 2,5 ml 2,5 ml ad 100 ml |
| RNase freies Wasser | Destilliertes Wasser DEPC (0,1 %) Über 16 Stunden inkubiert und anschließend autoklaviert | Gewünschte Menge |
| TAE Laufpuffer 50x Tris-Acetate-EDTA | Tris-Base (2 M) Natriumacetat (1 M) EDTA (0,5 M, pH 8) | 24,2 g 5,71 g 10 ml |
| TBE Laufpuffer 5x Tris-Borat-EDTA pH = 8 | Tris-Base (2 M) Natriumborat (1 M) EDTA (0,5 M , pH 8) H ₂ O | 54 g 27,5 g 20 ml ad 1000 ml |
| TBS Puffer 10x | Tris-Base (1 M) Tris-HCL (1 M) NaCl ad 1L (ph=7,6) | 250 ml 250 ml 87 g |

2.2 Methoden

2.2.1 Aufbereitung der Gewebeproben

2.2.1.1 mRNA-Isolierung aus Gewebeproben

Die mRNA-Isolierung erfolgte mit dem „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) in modifizierter Form nach Angaben des Herstellers. Die mRNA wird hierbei über ein System aus Wasch- und Trennsäulen unter Einsatz verschiedener Pufferlösungen und mehrerer Zentrifugationsschritte isoliert. Zum Zentrifugieren wurde eine Standard-Mikro-Zentrifuge („Biofuge“, Hereus) verwendet. Alle Arbeitsschritte zur Zellaufbereitung und mRNA-Isolierung wurden mit RNase-freien Materialien und Lösungen durchgeführt und fanden bei Raumtemperatur (RT) statt.

2.2.1.2 Quantifizierung der mRNA

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch. Die optische Dichte wurde bei 260 nm in einem UV-Photometer mit automatischer Quantifizierung (GeneQuant II, RNA/DNA Calculator; Pharmacia Biotech) gemessen. Die mRNA wurde nach der Isolierung bei -80 °C gelagert.

2.2.1.3 Reverse Transkription: Umschreiben von mRNA in cDNA

Bei der reversen Transkription wird durch die Reverse Transkriptase aus dem Moloney Murine Leukemia Virus mRNA in komplementäre cDNA (engl. „copied DNA“) umgeschrieben. Für die Reaktion wurde das „You Prime First Strand Beads Kit“ (Amersham) nach Angaben des Herstellers verwendet. Je Probe wurden 2 µg mRNA unter Zugabe von 1 µg Oligo-dT-Primern (Promega) bei 37 °C innerhalb einer Stunde in cDNA umgeschrieben. Die Oligo-dT-Primer sind komplementär zu der poly-A-Sequenz der mRNA. So wurde sichergestellt, dass nur mRNA umgeschrieben wurde. Anschließend wurden die Proben mit RNase-freiem Wasser auf 100 µl aufgefüllt, so dass die cDNA-Konzentration 20 ng/µl entsprach. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

2.2.2 Quantifizierung der Gen-Expression mittels real-time PCR

2.2.2.1 Prinzip der real-time PCR

Die Quantifizierung der cDNA erfolgte mittels real-time PCR mit dem Light Cycler (Roche Molecular Biochemicals) nach Angaben des Herstellers.

Bei der real-time PCR handelt es sich um eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung der spezifischen DNA-Sequenzen wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während eines PCR-Zyklus (daher der Name „real time“) durchgeführt. Zu diesem Zweck wird ein spezieller Farbstoff, „SYBR Green I“ (Roche), eingesetzt, der nur dann fluoresziert, wenn er an doppelsträngige DNA gebunden ist. Die Fluoreszenz des Farbstoffes wird zu den Zeitpunkten des PCR-Zyklus gemessen, bei denen die gesuchten DNA-Sequenzen (Templates) doppelsträngig vorliegen. Dieses ist am Ende der Amplifikation bei 72 °C der Fall. Die Fluoreszenz dieser Farbstoffe steigt proportional mit der Zielsequenzmenge an. Auf diese Weise ist mittels der Software des Herstellers Roche in Echtzeit („real-time“) eine direkte Quantifizierung der Templates möglich. Im Gegensatz zur herkömmlichen PCR ist eine anschließende gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente nicht mehr nötig. Die Daten sind sofort verfügbar und das Kontaminationsrisiko ist gering.

Während der ersten Zyklen der Amplifikationsphase einer PCR ist die Anzahl der Ziel DNA-Sequenzen (Templates) begrenzt und die Wahrscheinlichkeit, dass sich Templates, Primer und Polymerase treffen gering. In der dritten Phase (den letzten Zyklen) hingegen steigt die Menge der Reaktionsprodukte (Templates, Pyrophosphat, Monophosphatnucleotide) derart an, dass sie sich selbst hemmen und es häufiger zur Hybridisierung von Produktfragmenten kommt. Außerdem werden die Substrate verbraucht und die Polymerasen und Nukleotide durch die Hitze langsam zerstört. Ein exponentieller Anstieg der Templates findet sich daher nur in der mittleren Phase (Abb. 2), so dass diese zur Quantifizierung genutzt werden kann. Um immer am Anfang der exponentiellen Phase messen zu können, wird der sog. CT-Wert (engl. „cycle threshold“ (Schwellenwert Zyklus)) verwendet, der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Je niedriger der CT-Wert bei der jeweiligen

Messung ist, umso höher ist die Ausgangskonzentration der gesuchten DNA-Sequenz. In einem Graphen, auf dem die Fluoreszenz der Zyklenzahl gegenübergestellt ist, kann dieser Punkt als Wendepunkt des Graphen (engl. „crossing point“) mathematisch bestimmt werden. Abb. 3 zeigt exemplarisch die Standardverdünnungsreihe von hBD-3:

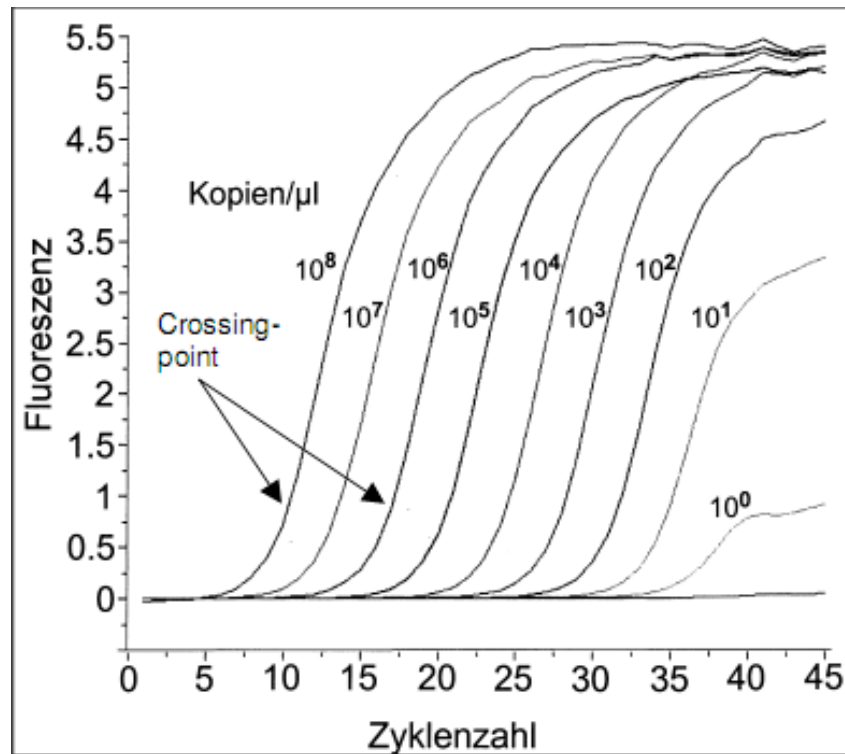


Abbildung 2: Standardverdünnungsreihe von hBD-3

In der Abbildung 2 ist die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zyklenzahl dargestellt. Die einzelnen Graphen entsprechen den Verdünnungsstufen der Standardverdünnungsreihe von 10^8 bis 10^0 Kopien/ μ l. Eingezeichnet ist beispielhaft der „crossing point“ für die Verdünnungsstufen von 10^8 und 10^6 .

Die Quantifizierung der gesuchten DNA-Sequenzen erfolgte mithilfe einer Standardverdünnungsreihe durch den Vergleich der „crossing points“ einer Messreihe mit den „crossing points“ einer Standardverdünnungsreihe.

2.2.2.2 Schmelzkurven

Am Ende eines real-time PCR-Laufes (45 Zyklen) werden Schmelzkurven erstellt, mit deren Hilfe eine Differenzierung zwischen dem spezifischen Produkt und eventuell entstandenen Primerdimeren möglich ist. So kann kontrolliert werden, ob nur die spezifische Gensequenz amplifiziert wurde. Dazu werden die Proben auf 65 °C für

15 Sekunden abgekühlt und dann langsam um 0,2 °C pro Sekunde auf 95 °C erhitzt, um die DNA-Doppelstränge voneinander zu trennen. Währenddessen wird kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen.

Durch das Anfertigen von Schmelzkurven lässt sich eine optimale Messtemperatur für die Fluoreszenzmessung bei einer PCR festlegen. Dabei wird die Messtemperatur so gewählt, dass sie oberhalb der Schmelzpunkte der unspezifischen Nebenprodukte und unterhalb des Schmelzpunktes der Templates liegt. So wird sichergestellt, dass nur die Konzentration der gesuchten Templates und nicht die der Nebenprodukte gemessen wird. Vor der eigentlichen Messreihe wird die Messtemperatur durch Vorläufe anhand der Schmelzkurven bestimmt. In Abb. 3 ist beispielhaft die Schmelzkurve von hBD-3 dargestellt. Der Messpunkt für die Fluoreszenzmessung von hBD-3 wurde hier bei 87 °C festgelegt.

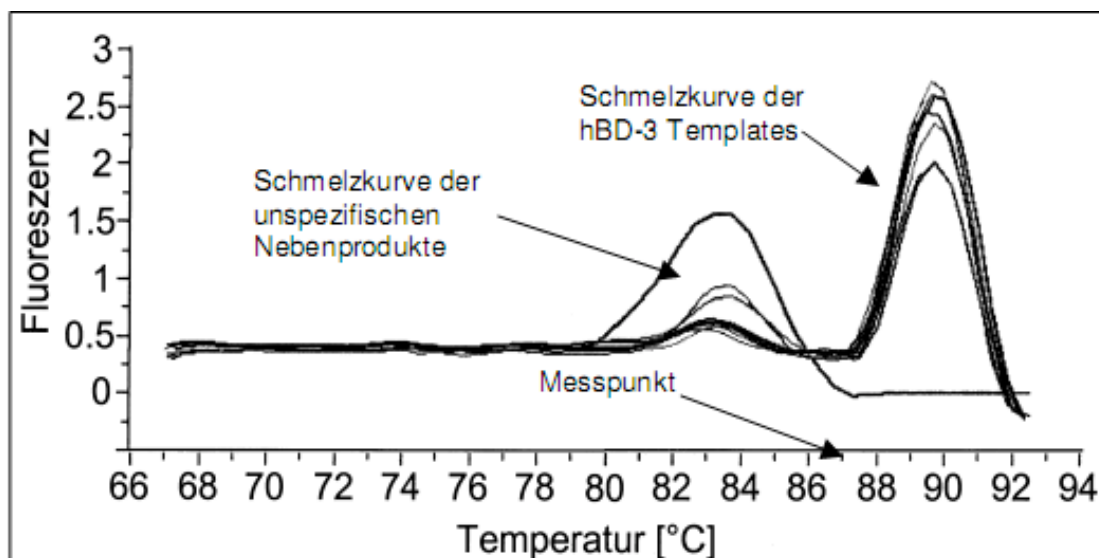


Abbildung 3: Schmelzkurve von hBD-3

Die Schmelzkurve dient der Unterscheidung der mit SYBR Green I (Roche) markierten PCR-Produkte von Primerdimeren, die eine geringere Schmelztemperatur aufweisen.

2.2.2.3 Verwendete Primer

Für alle PCRs wurden auf Grundlage der veröffentlichten mRNA-Sequenzen spezifische Intron-überspannende Primer ausgewählt, deren Sequenzen und Produktlängen in Tab. 2 dargestellt sind. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma ARK bezogen. Dabei wurde die Primer3 Software verwendet (Rozen und Skaletzky, zu finden über http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html).

Tabelle 10: Verwendete Primer (T_m = Schmelztemperatur in °C; Bp = Basenpaare)

| Primer | Genbank-Nr | Orientier. | Sequenz | Bp | T _m [°C] |
|-----------|-------------|--------------------|--|-----|---------------------|
| HNP 1-3 | NM 004084 | sense antisense | GCA GCG GAC ATC CCA GAA GT AAG GAA ATT GAG CAG AAG GTA CAG | 266 | 60 |
| HD5 | NM 021010 | sense antisense | GCC ATC CCT GCT GCC ATT C AGA TTT CAC ACC CCG GAG A | 241 | 60 |
| HD6 | NM 001926 | sense antisense | CCT CAC CAT CCT CAC TGC TGT TC CCA TGA CAG TGC AGG TCC CAT A | 266 | 60 |
| hBD-1 | NM 005218 | sense antisense | TTG TCT GAG ATG GCC TCA GGT GGT ATA CTT CAA AAG CAA TTT TCC TTT | 253 | 57 |
| hBD-2 | AF 448141 | sense antisense | ATC AGC CAT GAG GGT CTT GT GAG ACC ACA GGT GCC AAT TT | 173 | 58 |
| hBD-3 | NM 018661 | sense antisense | AGC CTA GCA GCT ATG AGG ATC CTT CGG CAG CAT TTT CGG CCA | 206 | 60 |
| Psoriasin | NM 002969.2 | sense antisense | AGA CGT GAT GAC AAG ATT GAC TGT CCT TTT TCT CAA AGA CGT C | 127 | 58 |
| RNase 7 | HSA 131212 | sense antisense | GGA GTC ACA GCA CGA AGA CCA CAT GGC TGA GTT GCA TGC TTG A | 235 | 60 |
| LL-37 | NM 004345 | sense antisense | GCC AAA GCC TGT GAG CTT C ACC CAG CAG GGC AAA TCT C | 190 | 57 |

2.2.2.4 Real-time PCR Ansatz und Durchführung

Ein 10 µl PCR-Ansatz im Fluoreszenz-Thermo Cycler enthält:

Tabelle 11: Ansatz für die real-time PCR

| Komponente | Konzentration | Menge |
|---|---------------|--------|
| cDNA der Probe | 20ng | 1 µl |
| MgCl ₂ (Roche) | 4 mM | 1,2 µl |
| sense Primer | 0,5 µM | 0,5µl |
| antisense Primer | 0,5 µM | 0,5µl |
| Light Cycler Fast Start DNA SYBR Green I Mix (Roche) (enthält Farbstoff und Taq Polymerase) | 1 x | 1 µl |
| <i>aqua dest.</i> | | 5,8 µl |

Die PCR im Fluoreszenz-Thermo Cycler wurde mit folgenden Parametern durchgeführt:

Tabelle 12: Amplifikationsprotokoll real-time PCR

| Schritt | Temperatur | Zeit |
|---------|------------|------|
|---------|------------|------|

| | | |
|---|--|-------------|
| 1. Initiale Denaturierung | 94° C | 10 min |
| 2. Denaturierung | 95° C | 10 sec |
| 3. Bindung der Primer | Annealingtemperatur | 5 sec |
| 4. Amplifikation | 72° C | 15 sec |
| 5. Fluoreszenzmessung | Durch Vorversuche anhand der Schmelzkurven ermittelt | wenige msec |
| 6. Schmelzkurve | Proben werden auf 65° C abgekühlt und dann um 0,2°C / sec auf 95° C erhitzt (siehe Abb. 5) | |
| Die Schritte 2-5 wurden 45 x wiederholt (45 Zyklen) | | |

Die SYBR Green I (Roche)-Fluoreszenz wurde nach Abschluss der Amplifikationsphase am Ende eines jeden Zyklus gemessen, um die Zunahme der Templates pro Zyklus zu ermitteln. Die Messtemperatur für die Fluoreszenzmessung wurde aus den Schmelzkurven für jedes Template spezifisch ermittelt. Die Annealingtemperatur ist die Temperatur, bei der die Primer an die DNA binden und liegt etwa 3-5 °C unter der Primer-Schmelztemperatur (T_m °C), die näherungsweise folgendermaßen berechnet wird:

$$T_m \text{ °C} = 4 \text{ °C} \times (\Sigma G + \Sigma C) + 2 \text{ °C} \times (\Sigma A + \Sigma T)$$

$$\text{Annealingtemperatur °C} = T_m \text{ °C} - 5 \text{ °C}$$

(T_m °C = Schmelztemperatur, G = Guanin, C = Cytosin, A = Adenin und T = Thymin)

2.2.2.5 Absolute Quantifizierung der antimikrobiellen Peptide

Voraussetzung für die absolute Quantifizierung über externe Standards ist, dass der Standard die Sequenz der gesuchten Ziel-DNA in exakt bekannter Konzentration enthält. Um die Transkriptmenge der verschiedenen antimikrobiellen Peptide exakt zu bestimmen wurden externe Standardkurven für jedes Zielgen erstellt.

Zur Generierung eines Standards wurden Target-cDNA-Fragmente in einen Plasmid-Vektor kloniert, in *E. coli* amplifiziert, aufgereinigt und quantifiziert. Anschließend wurde die Zahl der Kopien in der Stammlösung berechnet und Verdünnungsreihen von 10^8 - 10^0 Kopien/µl angesetzt. Jeder Ansatz zeigte eine messbare Fluoreszenz ab einer, von seiner Ausgangskonzentration abhängigen, Zyklenzahl. Aus diesen Daten wurden Standardkurven erstellt. Die Werte aus 7–8 Standardkurven wurden gemittelt

und so ergab sich eine charakteristische Standardkurve für jedes Peptid, welche die exakte Quantifizierung der Zielsequenz und den direkten Vergleich von Konzentrationen unterschiedlicher Zielsequenzen ermöglichte. Die Erstellung der Standardkurven und die Bestimmung der Kopienzahl in den Proben erfolgten mit Hilfe der Software Excel (Microsoft).

2.2.3 Generierung externer Standards

Die im Folgenden beschriebene Konstruktion der Standards wurde von Frau Dipl.-Biologin Gabriele Brunke im Rezeptor- und Hormonlabor durchgeführt. Die Standards wurden freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

2.2.4 TaqMan Low-Density Arrays

Es wurden mit TaqMan Low-Density Array Real-Time PCR (Applied Biosystems) die mRNA Expression von 49 für die Regulation von Immunantworten als von höchster Wichtigkeit beschriebenen Genen und von drei Kontrollgenen (*ACTB*, *GAPDH* und *18S*) analysiert. Diese Arbeiten fanden in Kooperation mit Herr Dr. Robert Häsler (IKMB Kiel) statt. Hierzu wurden 35 ng RNA mit dem Mastermix zusammen in die Probenfächer der Micro Fluidic Cards geladen. Diese wurden anschließend verschlossen und mit 256 *g* für 10 min zentrifugiert. Jede der Micro Fluidic Cards wurde mit der ABI 7900 HT Plattform (Applied Biosystems) analysiert. Die PCR Bedingungen waren: 2 min bei 50° C, 10 min bei 95° C, und abschließend 40 Zyklen von 30 s bei 97° C und 1 min bei 60° C.

2.2.5 Analyse der 16S rRNA – bakterielle Beteiligung

2.2.5.1 Bakterien-Stämme, Plasmide und Standard Kurven

Es wurden die Stämme und Plasmide benutzt, die kürzlich beschrieben wurden (Ott *et al.*, 2004a). Zur Herstellung der Clone-Bibliothek wurde PCR mit den Primern TPU1 (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) und RTU8 (AAGGAGGTGATCCANCCRCA) durchgeführt. Die DNA wurde anschließend in kompetente *Escherichia coli* Zellen mit dem pCR2.1 TOPO TA cloning kit (Invitrogen, Karlsruhe) transformiert und nach nächtlicher Kultur wurde Plasmid-DNA mit dem QIAprep 96 Turbo miniprep kit (Qiagen, Hilden) extrahiert. Die Sequenzierung wurde mit einem ABI Prism 3700 DNA Analyzer durchgeführt.

Zellzählungen (Colony forming units – CFU) wurden mit einer Neubauer Kammer mehrfach und von zwei unabhängigen Untersuchern durchgeführt. Nach Herstellung von Verdünnungsreihen erfolgte eine erneute Zählung durch dieselben Untersucher. Um eine Standardkurve für die real-time PCR zu generieren wurde die bakterielle DNA von den unterschiedlichen Verdünnungen (s.o.) extrahiert und die Konzentration entsprechend angepasst. 1 µl DNA entsprach dementsprechend einer definierten Anzahl von CFU (10^0 bis 10^8). Für die C_T Werte der unterschiedlichen Verdünnungen wurden Mittelwerte gebildet und die absolute Zellzahl wurde durch Standardkurven wie bereits beschrieben (Lyons *et al.*, 2000) interpoliert.

2.2.5.2 DNA Isolierung von Bakterienkulturen

Nachdem die Verdünnungsreihen der Referenzstämme in den Neubauer Kammern gezählt wurden, wurden die Bakterien zentrifugiert (8,000 g, 10 min bei Raumtemperatur). Die DNA wurde anschließend nach mechanischer Homogenisierung mit dem FastDNA spin kit for soil (Bio 101) nach Herstellerangaben präpariert.

2.2.5.3 Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE)

DGGE Analysen wurden mit denaturierenden Gradienten-Gelen von 18-38% durchgeführt (Gomes *et al.*, 2003) und die DNA Fragmente wurden anschließend extrahiert (Schwieger and Tebbe, 1998). Diese DNA wurde in den weiteren Experimenten genutzt.

2.2.5.4 Design der Sonden für die real-time PCR

Fluoreszenz gelabelte Oligonukleotid Sonden wurden mit Hilfe des Probe Design tool of the ARB software package (W. Ludwig, Department of Microbiology, Technical University, Munich, Germany; <http://www.arb-home.de/>, Januar 2002) generiert.

2.2.5.5 Real-time PCR

Amplifizierung und Detektion wurden in 96-well Platten auf einem ABI Prism 7700 sequence detector mit dem TaqMan Universal PCR 2x master mix (Applied Biosystems) durchgeführt. Die gesamte 16S rRNA Sequenz wurde amplifiziert. Die verwendeten Primer hybridisieren in konservierten Regionen des 16S rRNA Gens. Der „forward Primer“ TPU1 (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) bindet die Position 8 bis

27 und der „reverse Primer“ RTU8 (AAGGAGGTGATCCANCCRCA) hybridisiert mit den Positionen 1522 bis 1541 (*Escherichia coli* als Referenznummerierung).

2.2.5.6 Silberfärbung der DGGE-Gele

Die Gele werden nach Beendigung des Laufes aus der Elektrophoresekammer entnommen und sofort gefärbt. Die auf diese Weise konservierten Gele können für längere Zeit ohne Schäden an der DNA bei Raumtemperatur gelagert werden.

2.2.5.7 Auswertung der Bandenmuster

Zur weiteren digitalen Bearbeitung werden die fertigen DGGE-Gele mit einem Durchsichtscanner eingescannt und mit Hilfe der GelCompareII-Software (Applied Maths, Kortrijk, Belgien) bearbeitet. Die Diversität der Bakterien wurde nach *Seksik et al.* als Anzahl der vorhandenen Banden berechnet sowie als gewichteter Diversitätsindex, in welchen neben der Anzahl der Banden auch deren Intensität sowie deren relative Position zueinander eingeht. Die Cluster-Analyse der DGGE-Profile wurde ebenfalls durchgeführt wie früher bei *Ott et al.* beschrieben (Ott et al, 2004).

2.2.6 Statistische Analysen

Die Darstellung der ermittelten Ergebnisse erfolgte nach Berechnung der Mittelwerte aller Messergebnisse in einer Gruppe plus Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Zur wissenschaftlichen Signifikanzprüfung wurde eine statistische Prüfung mittels einseitigem Student-Test (t-test) angewandt. Als signifikant gilt hierbei ein p-Wert von $<0,05$. Die Berechnung der Werte wurde mit der Software Excel (Microsoft) durchgeführt, ebenso die Erstellung der Diagramme.

3 Ergebnisse

In der Arbeit wurde die mRNA-Expression von antimikrobiellen Peptiden und deren Regulatoren, für die bisher eine Rolle bei anderen entzündlichen Prozessen im Dünn- und Dickdarm beschrieben wurde, mittels Real-time-PCR analysiert. Hierzu wurden Proben der Appendix von Patienten mit akuter Appendizitis und von Kontroll-Individuen verglichen. Zusätzlich wurde auch ein Vergleich zu der Expression im gesunden Ileum- und Colon-Proben durchgeführt.

Bei der Quantifizierung der Gen-Expression der antimikrobiellen Peptide und Zytokine wurde in einem PCR-Ansatz jeweils eine Menge von 20 ng mRNA eingebracht. Alle Angaben der Gen-Expression beziehen sich daher im Folgenden auf eine eingebrachte mRNA Menge von 20 ng. Zusätzlich wurde noch ein TaqMan Low Density Array für Entzündungsmediatoren und intrazelluläre Moleküle durchgeführt und mittels 16S rRNA-Analyse die bakterielle Diversität analysiert.

3.1 Gen-Expression der α -Defensine

3.1.1 Die Gen-Expression von HNP1-3

Die Defensine HNP1-3 konnten sowohl bei akuter Appendizitis als auch im gesunden Appendix nachgewiesen werden (Abbildung 4). Im Rahmen der akuten Appendizitis wurde HNP1-3 signifikant ($p < 0,05$) vermehrt exprimiert. Mit 1297 Kopien (SEM 441) HNP1-3/20ng mRNA lag die Expression im Vergleich zur Expression in den Proben des gesunden Appendix mit 273 Kopien (SEM 65) um den Faktor fünf höher.

Das gesunde Ileum und das gesunde Colon zeigten Expression von HNP1-3 an, jedoch mit sehr niedrigen Transkriptzahlen.

3.1.2 Die Gen-Expression von HD5

Die Expression von HD5 konnte in allen Proben mit hoher Anzahl von Kopien (Abbildung 4) nachgewiesen werden. Am höchsten war die Expression im gesunden Ileum. Dies ist auf die bekannte konstante Expression und Lagerung des α -Defensin in den Panethzellen und Granulozyten zurückzuführen. Im gesunden Appendix wurde HD5 mit einer Transkriptzahl von 24716 (SEM 9274) gefunden, die sich im Rahmen der akuten Appendizitis um den Faktor 4 auf 100592 Kopien (SEM 48224) erhöhte.

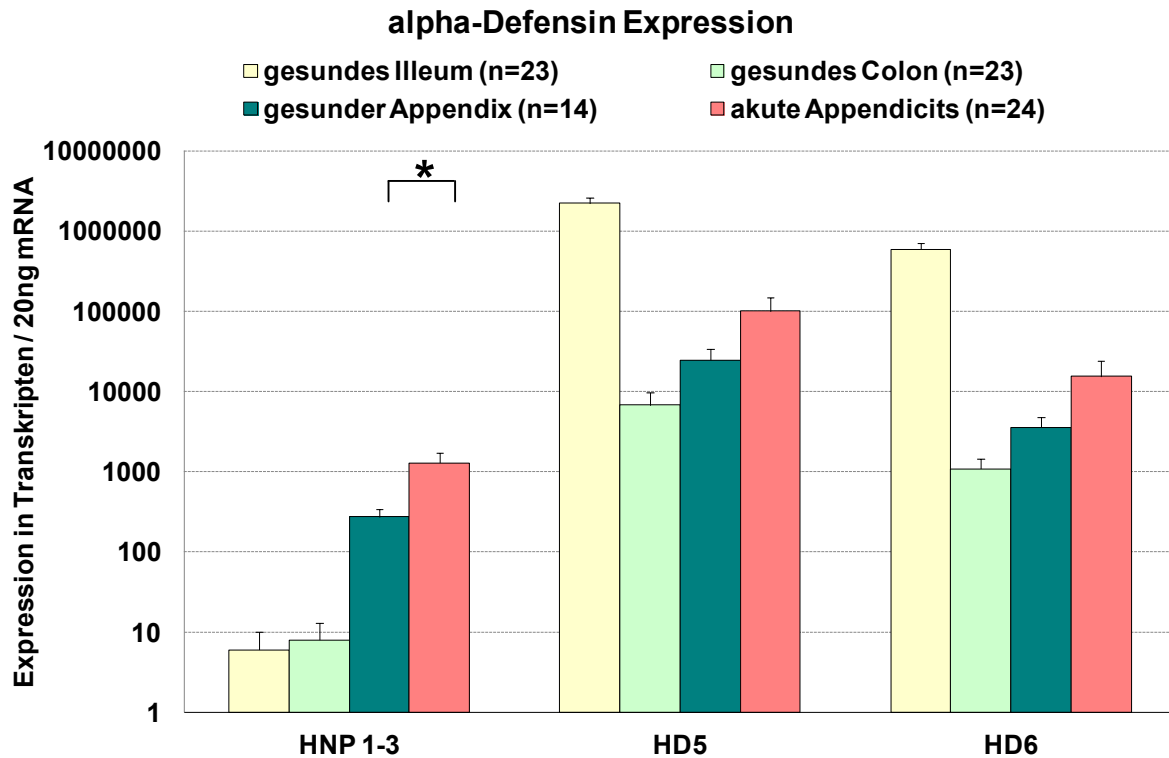


Abbildung 4: Expression der alpha-Defensine

Die Analyse der Expression erfolgte mittels real-time PCR Untersuchungen mit Gen-spezifischen Primern an mRNA aus Biopsien von gesunden Kontrollpersonen und von Proben des entzündeten Appendix. N-Zahlen sind auf der X-Achse mit angegeben. Darstellung der Mittelwerte der Transkriptzahlen und SEM der α -Defensine in 20 ng mRNA der analysierten Proben. * zeigt p-Werte von <0,05 an.

3.1.3 Die Gen-Expression von HD6

Das Expressionsmuster von HD6 ähnelte dem des HD5. Hier zeigten sich zwar geringere Kopienzahlen, aber das Expressionsverhalten war sehr ähnlich. Auch hier war die stärkste Expression im gesunden Ileum mit 592914 Kopien (SEM 113891) nachweisbar. Die Expression während einer akuten Appendizitis war auch hier 4 Mal höher als im gesunden Appendix. Die Anzahl der Kopien stieg von 3610 (SEM 1210) auf 15533 Kopien (SEM 8820).

3.2 Gen-Expression der β -Defensine

3.2.1 Die Gen-Expression von hBD-1

Das β -Defensin hBD-1 konnte in allen vier Gruppen (Ileum, Colon, entzündeter und nicht entzündeter Appendix) mit einer hohen Transkriptzahl nachgewiesen werden. Das gesunde Colon wies die höchste Expression mit 24067 Kopien (SEM 3864) auf, gefolgt vom gesunden Ileum mit 9593 Kopien (SEM 1177) und dem gesunden Appendix mit einer Gen-Transkriptzahl von 5371 (SEM 1539). Im Rahmen der akuten Appendizitis kam es zu einem signifikanten Abfall ($p < 0,05$) der Kopienzahl auf nahezu ein fünftel mit 1215 Kopien (SEM 347).

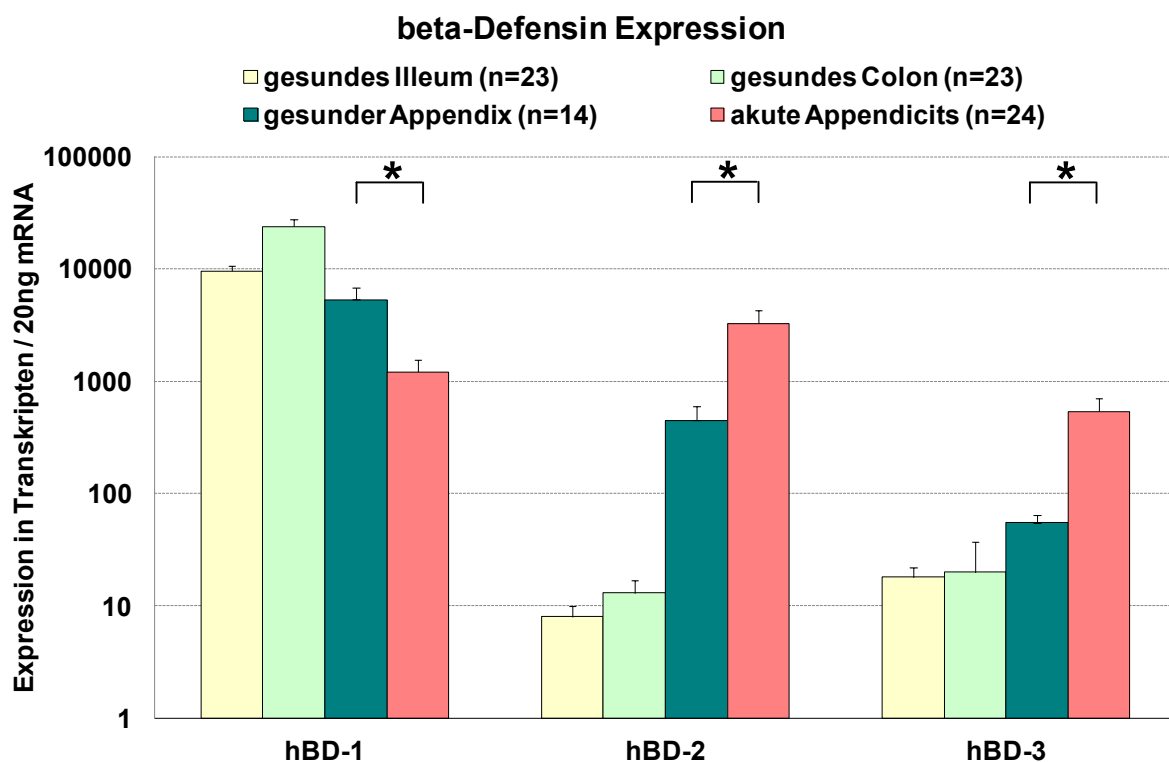


Abbildung 5: Expression der β -Defensine

Die Analyse der Expression erfolgte mittels real-time PCR Untersuchungen mit Gen-spezifischen Primern an mRNA aus Biopsien von gesunden Kontrollpersonen und von Proben des entzündeten Appendix. N-Zahlen sind auf der X-Achse mit angegeben. Darstellung der Mittelwerte der Transkriptzahlen und SEM der β -Defensine in 20 ng mRNA der analysierten Proben. * zeigt p-Werte von $< 0,05$ an.

3.2.2 Die Gen-Expression von hBD-2 und hBD-3

Das Expressionsmuster von hBD-2 und hBD-3 war sehr ähnlich. Im gesunden Ileum und Colon zeigte es im Gegensatz zu dem von hBD-1 eine geringe basale Expression. Der gesunde Appendix exprimierte das hBD-2-Gen mit einer Anzahl von 450 Kopien (SEM 146) und das hBD-3-Gen mit einer Transkriptzahl von 56 (SEM 9). Beide β -Defensine zeigten einen signifikanten Anstieg ($p < 0,05$) im Rahmen der akuten Appendizitis. So vermehrte sich die Expression von hBD-2 um das Siebenfache auf 3278 Kopien (SEM 1020) und von hBD-3 um den Faktor 10 auf 541 Kopien (SEM 171).

3.3 Messung der Gen-Expression von RNase 7

RNase 7 zeigte im gesunden Appendix mit 262 Kopien (SEM 84) die höchste Expression. Bei akuter Appendizitis sank hier die mittlere Transkriptzahl auf 105 Kopien (SEM 25), aber dennoch deutlich nachweisbar im Gegensatz zum gesunden Ileum mit 23 Kopien (SEM 4) und zum gesunden Colon mit einer Anzahl von 19 Kopien (SEM 5). Die nachgewiesenen Veränderungen erreichten allerdings kein Signifikanzniveau.

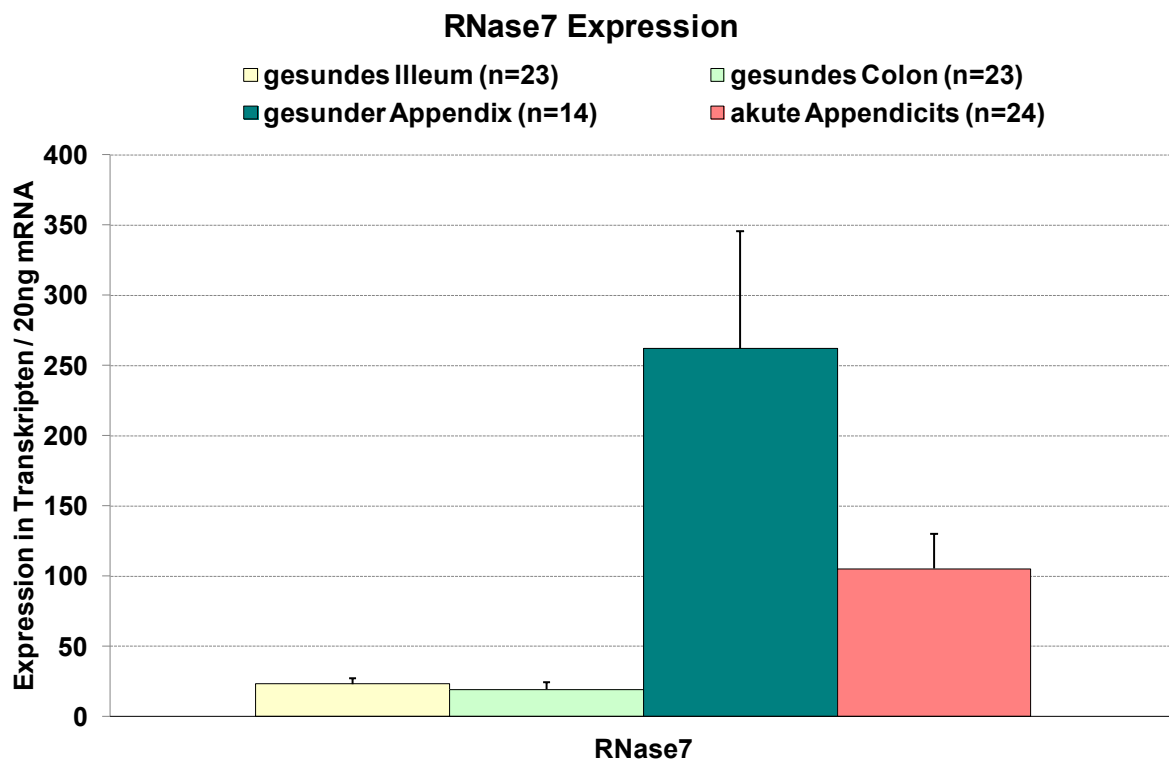


Abbildung 6: RNase 7-Expression

Die Analyse der Expression erfolgte mittels real-time PCR Untersuchungen mit Gen-spezifischen Primern an mRNA aus Biopsien von gesunden Kontrollpersonen und von Proben des entzündeten Appendix. N-Zahlen sind auf der X-Achse mit angegeben. Darstellung der Mittelwerte der Transkriptzahlen und SEM der RNase 7 in 20 ng mRNA der analysierten Proben.

3.4 Gen-Expression der Zytokine

Die Abbildung 7 veranschaulicht die unterschiedlichen Expressionsmuster der Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-10. In die Auswertung sind hier insgesamt je 12 Proben aus dem gesunden Ileum, Colon und Appendix und 13 Proben mit akuter Appendizitis aufgenommen worden.

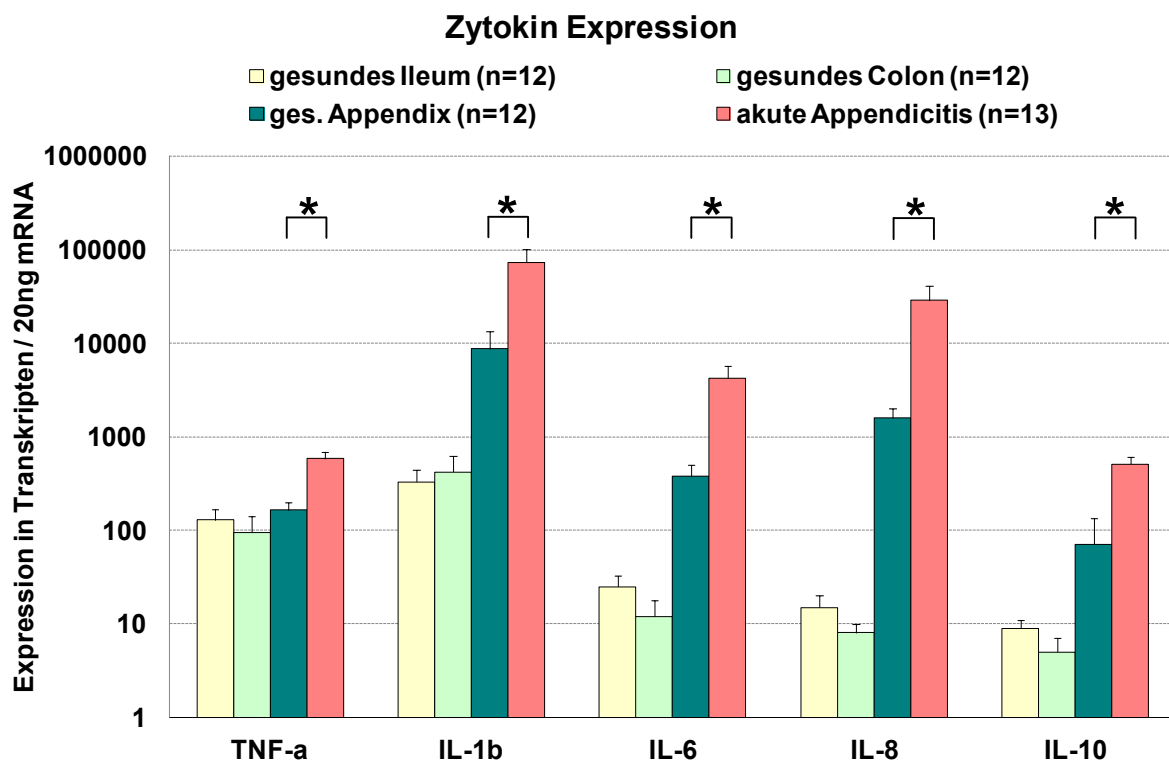


Abbildung 7: Zytokin-Expression

Die Analyse der Expression erfolgte mittels real-time PCR Untersuchungen mit Gen-spezifischen Primern an mRNA aus Biopsien von gesunden Kontrollpersonen und von Proben des entzündeten Appendix. N-Zahlen sind auf der X-Achse mit angegeben. Darstellung der Mittelwerte der Transkriptzahlen und SEM der Zytokine in 20 ng mRNA der analysierten Proben. * zeigt $p < 0,05$. * zeigt p-Werte von $< 0,05$ an.

TNF- α und IL-1 β wiesen ein ähnliches Expressionsmuster auf, wie das von Ihnen regulierte hBD-2 in den verschiedenen Proben. In den gesunden Darmabschnitten wurde TNF- α im Appendix mit einer Transkriptzahl von 165 (SEM 36) am höchsten

exprimiert. Diese Expression verdreifachte sich ($p < 0,05$) bei akuter Appendizitis auf 582 Kopien (SEM 114). Ähnlich verhielt sich auch die Expression von IL-1 β . Am höchsten nachzuweisen bei akuter Appendizitis mit 73312 Kopien (SEM 27787). Hier stieg die Transkriptzahl von IL-1 β um das Achtfache der Transkriptzahl im gesunden Appendix signifikant an (8746 Kopien, SEM 4584; $p < 0,05$).

Die Interleukine (IL) -6, -8 und -10 waren im gesunden Ileum und Colon mit sehr geringen Transkriptzahlen kaum nachweisbar. Im Gegensatz dazu wurden diese Interleukine im gesunden Appendix höher exprimiert. Im Rahmen der akuten Appendizitis kam es zu einem signifikanten ($p < 0,05$) Anstieg dieser schon im Vergleich zum übrigen Darm erhöhten Expressionslevel. IL-6 wurde im gesunden Appendix mit 378 Kopien exprimiert und steigerte seinen Wert bei akuter Appendizitis auf das 11-fache mit 4259 Kopien (SEM 1431). Auch IL-8 wurde mit einer deutlich hohen Transkriptzahl von 28595 Kopien bei akuter Appendizitis nachgewiesen, was das 18-fache der Gen-Expression im gesunden Appendix ausmacht (1582 Kopien, SEM 431). IL-10 wurde im gesunden Appendix mit 71 Kopien (SEM 63) nachgewiesen und bei akuter Appendizitis mit 510 Kopien (SEM 99).

3.5 Gen-Expression der Toll-like Rezeptoren 1-10

Die Abbildung 8 zeigt die unterschiedliche Verteilung und das Expressionsverhalten der Toll-like Rezeptoren (TLR) 1-10 in gesundem Appendix-Gewebe und in Proben während einer akuten Appendizitis.

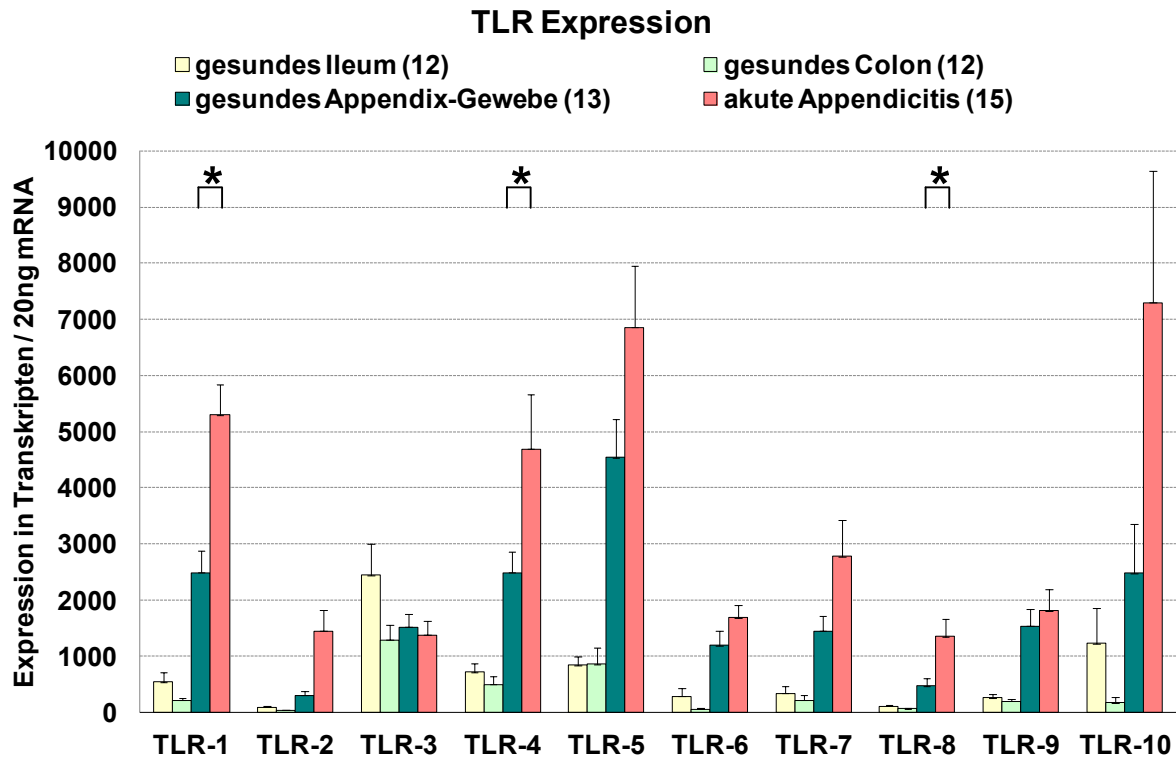


Abbildung 8: Expression der TLR-1-10

Die Analyse der Expression erfolgte mittels real-time PCR Untersuchungen mit Gen-spezifischen Primern an mRNA aus Biopsien von gesunden Kontrollpersonen und von Proben des entzündeten Appendix. N-Zahlen sind auf der X-Achse angegeben. Darstellung der Mittelwerte der Transkriptzahlen und SEM der TLRs in 20 ng mRNA der analysierten Proben. * zeigt p-Werte von $<0,05$ an.

Alle TLR sind sowohl im gesunden als auch während des akuten Entzündungsgeschehens vertreten. TLR-3, TLR-6 und TLR-9 zeigten kaum Veränderungen ihrer Expressionsniveaus. Im Rahmen der akuten Appendizitis kam es zu einer deutlichen Steigerung der Expressionsrate des TLR-2 von 302 Kopien (SEM 84) auf das Fünffache mit 1447 Kopien (SEM 367), wobei hier kein Signifikanzniveau erreicht wurde. Aufgrund einer hohen Streuung zwischen den Proben waren die nachgewiesenen Unterschiede der TLR-10 Expression mit einer dreifachen Steigerung der Transkriptzahlen von 2482 Kopien (SEM 875) auf 7297 (SEM 2342) ebenfalls nicht signifikant.

Im Gegensatz hierzu waren die nachgewiesenen Steigerungen in der Expression der TLR-1, -4 und -8 signifikant und lagen um den Faktor 2-4 oberhalb der Expression des nicht entzündlich veränderten Appendix (p-Wert $<0,05$).

3.6 TaqMan Low Density Array

Um neben der gezielten Untersuchung der bisher geschilderten Mediatoren der angeborenen und erworbenen Immunität auch einen Einblick in weitere möglicherweise beteiligte Regulatoren zu erhalten, wurde ein TaqMan Low Density Array durchgeführt (Abbildung 9).

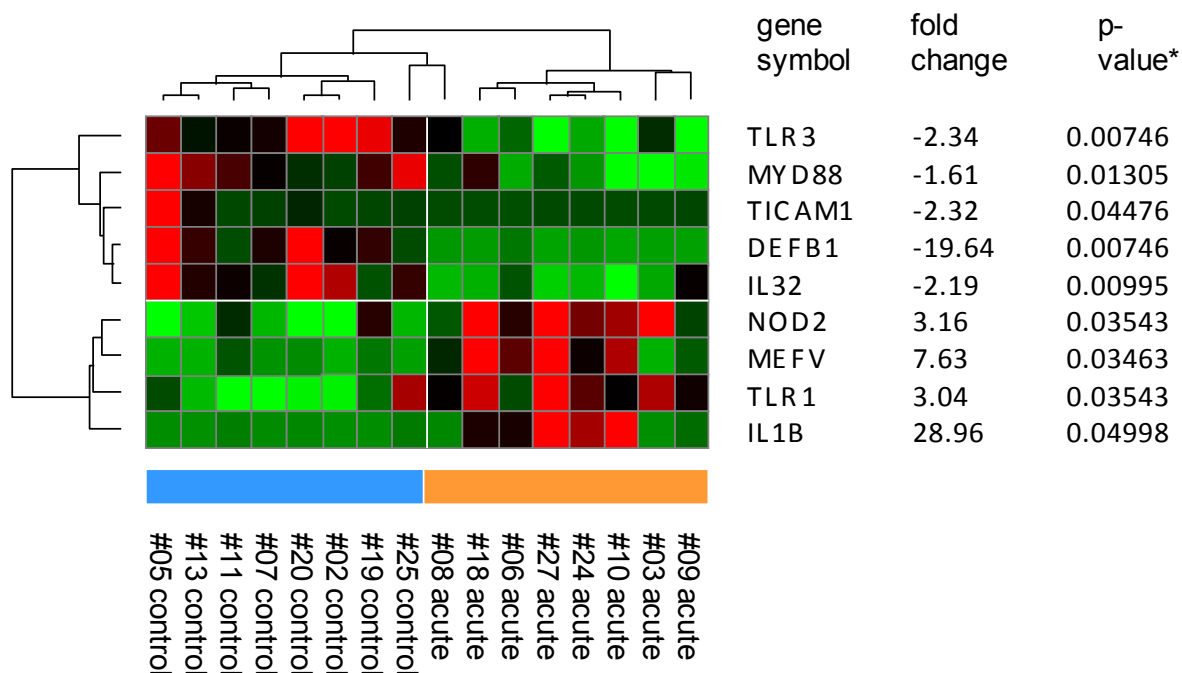


Abbildung 9: TaqMan Low Density Array

Clusteranalyse der Kandidaten Transkripte. Basierend auf den Expressionwerten der hier aufgeführten 9 am signifikantesten regulierten Gene wurde eine sogenannte „heatmap“ (links) erstellt. Veränderungen der Expression im nicht entzündeten vs. dem entzündeten Appendix (jeweils n=8) sind als „fold change“ (rechts) dargestellt. Die Berechnung der p-Werte erfolgte mittels des Mann-Whitney U-Test.

Hierbei konnten die durch die real-time PCR Untersuchungen signifikanten Veränderungen in der Expression der in dem Array ebenfalls enthaltenen Gene TLR1, TLR3 und IL1 β verifiziert werden (s.o.). Weiterhin wurde eine deutliche Induktion der Expression von dem intrazellulären Rezeptor für bakterielle Zellmembranbestandteile NOD2 nachgewiesen.

In der Appendizitis kommt es im Vergleich zum nicht entzündeten Appendix zu einer Induktion der NOD2 Expression um den Faktor 3 ($p < 0,05$). Da es sich beim NOD2 um einen Rezeptor für das Muramyl-Dipeptid, ein Bestandteil der Zellmembran

sowohl Gram-positiver als auch Gram-negativer Bakterien, handelt, wurde als nächstes die bakterielle Diversität im Rahmen der akuten Appendizitis untersucht.

3.7 16S rRNA-Analyse

Die Zusammensetzung der Microbiota rückt zunehmend in den Fokus der Erklärung pathophysiologischer Vorgänge bei gastrointestinalen und extraintestinalen Erkrankungen (Musso *et al.*, 2011; Nagy-Szakal and Kellermayer, 2011).

Um die Veränderungen in der Zusammensetzung der Microbiota bzw. die Beteiligung von Bakterien im Allgemeinen an der akuten Appendizitis weiter zu untersuchen, wurden 16S rRNA basierte Methoden angewandt.

Mittels community fingerprinting (DGGE) an 5 entzündeten und 5 normalen Appendices konnte ein verschiedenes Bandenmuster bei der akuten Appendizitis im Vergleich zum nicht entzündeten Appendix nachgewiesen werden (Abbildung 10).

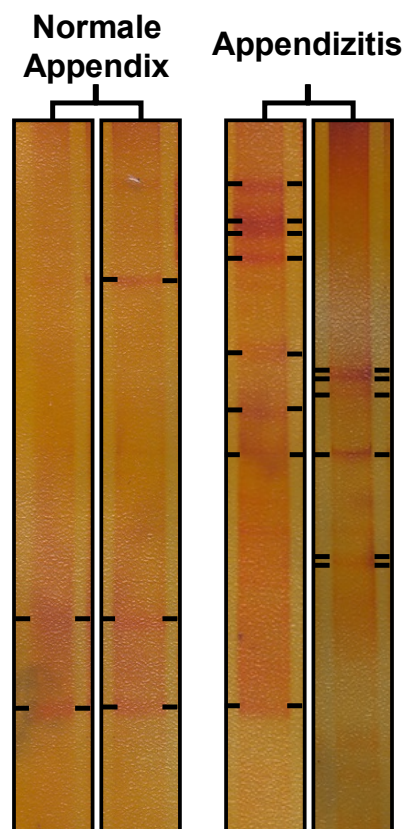


Abbildung 10: DGGE Analyse der 16S rRNA

DGGE Analyse der Microbiota. Repräsentative Darstellung eines Gels an Material von einem normalen und einem entzündeten Appendix.

Durch den Vergleich mit den Proben aus dem nicht entzündeten Appendix konnte eine deutlich erhöhte Anreicherung von Bakterien (Richness, entsprechend der Anzahl der Banden) in Geweben mit Appendizitis nachgewiesen werden (Abbildung 11). Hierbei wurden die Anzahl der Banden in der Appendizitis mit der Anzahl der Banden im nicht entzündeten Appendix-Gewebe verglichen. Die bakterielle Diversität (Abbildung 11) war im Rahmen der Appendizitis ebenfalls gesteigert. Diese Messgröße berücksichtigt neben der Bandenanzahl auch die Stärke der Banden (gemessen durch Densitometrie) und ihre relative Position.

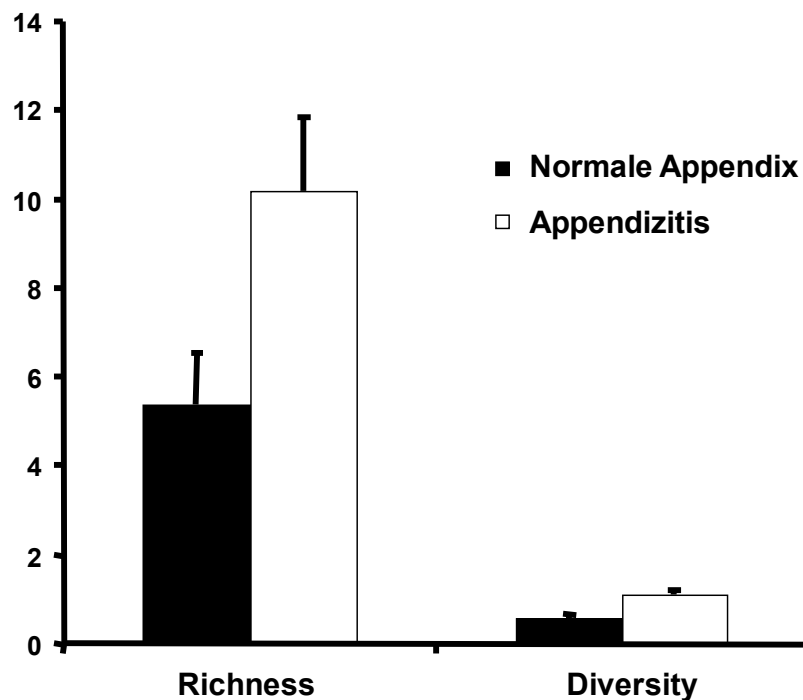


Abbildung 11: 16S rRNA Analyse

DGGE Analyse der Microbiota. Mittelwerte mit Standardabweichung der „Richness“ und „Diversity“ von fünf normalen und fünf entzündeten Appendices.

4 Diskussion

4.1 Expression der antimikrobiellen Peptide in der Appendizitis

4.1.1 Alpha-Defensine

Im Vergleich zum gesunden Colon weist der gesunde Appendix insgesamt höhere Expression der α -Defensine auf. Da der Appendix zu den extramedullären Immunorganen gezählt wird und hier eine grosse Anzahl an Lymphozyten auch unter nicht entzündlichen Bedingungen gefunden werden kann, war dieser Befund nicht unerwartet.

Die Defensine HD5 und HD6 werden typischerweise im Dünndarm aufgrund der vorherrschenden Lokalisation der Panethzellen in den Krypten des Dünndarms mit einer Kopiezahl von etwa 10^6 Kopien pro 20 ng mRNA nachgewiesen (Harder *et al.*, 2007; Wehkamp *et al.*, 2005; Wehkamp *et al.*, 2007a; Wehkamp *et al.*, 2007b). Da Panethzellen auch Bestandteil des Epithels des Appendix sind, war ein Nachweis der HD5 und HD6 Expression im gesunden Appendix zu erwarten. Dementsprechend lagen die Expressionslevel dieser beiden α -Defensine im gesunden Ileum am höchsten, aber auch in den Gewebeproben des gesunden Kolon und Appendix wurden HD5 und HD6 nachgewiesen. Im Rahme der akuten Appendizitis kommt es zu einem deutlichen Anstieg der HD5- und HD6 Expression. Bisher ist wenig über die Funktion dieser beiden sogenannten „Panethzell-Defensine“ ausserhalb der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Zilbauer *et al.*, 2011) bekannt. Neuere Arbeiten zeigen eine mögliche Beteiligung an der Regulation der Microbiota Zusammensetzung (Salzman, 2010) was hinsichtlich der in dieser Arbeit beschriebenen Veränderungen der bakteriellen Diversität von Interesse ist.

Die Defensine HNP1-3, deren Speicherort die neutrophilen Granulozyten sind (Wehkamp *et al.*, 2006a; Zou *et al.*, 2007), weisen im entzündlichen Appendix einen fünffachen Anstieg der Kopien pro 20 ng mRNA auf. Dies korreliert sehr gut mit der bekannten frühen Infiltration neutrophiler Granulozyten an den Ort der akuten Entzündung und mit der bereits angesprochenen Funktion des Appendix als lymphatisches Organ mit Beherbergung und Bereitstellung immunkompetenter Zellen. Gerade die Vermittlung der bakteriellen Phagozytose durch HNP1-3 (Soehnlein *et al.*, 2008) und die Verstärkung entzündlicher Reaktionen durch die

vermehrte TNF- α und INF Produktion durch diese α -Defensine können als Versuch des Immunsystems, die bakterielle Invasion während der Appendizitis (siehe Ausführungen zur NOD2-Expression) zu terminieren, gewertet werden.

4.1.2 Beta-Defensine

HBD-1 wird ubiquitär und konstant auf hohem Expressionsniveau produziert (Frye *et al.*, 2000; Hosaka *et al.*, 2008; O'Neil, 2003). Am höchsten zeigt sich die Expression dieses β -Defensins im gesunden Colon, gefolgt vom gesunden Ileum und zuletzt des gesunden Appendix. Das Expressionsverhalten des β -Defensin hBD-1 bei akuter Appendizitis zeichnet sich hier nicht durch einen Anstieg der Expression aus. Interessanterweise kommt es zu einem Abfall auf 1215 Kopien (SEM 347). Eine ähnliche Herabregulation der hBD-1 Expression wurde im Rahmen von Infektionen von Enterotoxin-bildenden Keimen im Darm beschrieben (Chakraborty *et al.*, 2008), was eine Beteiligung von solchen Bakterien bei der Appendizitis im Zusammenspiel mit den 16S rRNA Analysen nahelegt (s.u.). Für die Infektion mit *Cryptosporidium parvum* konnte ebenfalls ein suppressiver Effekt auf die hBD-1 Expression nachgewiesen werden (Zaalouk *et al.*, 2004). Hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl Cholera-Toxin als auch Enterotoxin von ETEC über noch nicht komplett geklärte cAMP-regulierte Mechanismen (Chakraborty *et al.*, 2008) die Expression sowohl von hBD-1 als auch von LL37 hemmt. hBD-1 wird ubiquitär exprimiert, aber im Vergleich zu den anderen AMP ist seine bakterizide Potenz relativ niedrig. Da kürzlich gezeigt werden konnte, dass unter reduktiven Bedingungen hBD-1 allerdings hochpotent gegenüber verschiedenen Gram-positiven Bakterien ist (Schroeder *et al.*, 2011a; Schroeder *et al.*, 2011b), ist es interessant zu spekulieren, ob solche Bedingungen prinzipiell im Rahmen der akuten Entzündung des Appendix auftreten können und die Herabregulation von hBD-1 damit zu einer schlechteren Bekämpfung vor allem Gram-positiver Bakterien beiträgt.

Im Gegensatz zu hBD-1 werden hBD-2 und hBD-3 in den meisten Bereichen des Gastrointestinaltraktes auf relativ niedrigem Niveau exprimiert und deren Expression durch verschiedenste entzündliche Stimuli induziert (Agerberth and Gudmundsson, 2006; Dann and Eckmann, 2007; Wehkamp *et al.*, 2005). Im Einklang mit diesen Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen sind hBD-2 und hBD-3 im gesunden Ileum und Colon mit einer Kopiezahl von <50 Kopien pro 20 ng mRNA kaum nachweisbar. Im Rahmen der akuten Appendizitis steigt die Transkriptzahl der beiden Defensine

um ein Vielfaches. Da bekannte Induktoren der β -Defensin Expression, wie IL-1 β (Pahl *et al.*, 2011; Wehkamp *et al.*, 2006b) und TNF- α (Albanesi *et al.*, 2007; Kota *et al.*, 2008) vermehrt in Rahmen der akuten Appendizitis im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, liegt es nahe dass durch diese auch die Induktion von hBD-2 und hBD-3 im Rahmen der Appendizitis vermittelt werden. Interessanterweise können die vermehrt nachgewiesenen TLR-1, -4 und -8 sowohl als Induktoren als auch als Effektoren der Defensin-Antwort fungieren (Chen *et al.*, 2007; Sugawara *et al.*, 2006; Sumikawa *et al.*, 2006), so dass hier funktionelle Regelkreise vermutet werden können.

4.1.3 RNase 7

Im Gegensatz zu der beobachteten Induktion der hBD-2 und hBD-3 Expression kommt es zu einer Suppression der RNase 7 Expression im Rahmen der Appendizitis, die allerdings aufgrund der hohen SEM und der niedrigen Transkriptzahl nicht signifikant war. Für dieses antimikrobielle Peptid wurden wichtige Funktionen in der Immunabwehr der Haut und des Urogenitaltrak beschrieben (Harder and Schroder, 2002; Harder and Schroder, 2005a; Spencer *et al.*, 2011). Seine Rolle und Expression im Gastrointestinaltrakt sind bisher weitestgehend unbekannt (Kiehne *et al.*, 2007). Eventuell kann eine ähnliche Regulation der Expression wie bei der Expression von hBD-1 durch Enterotoxine angenommen werden (Chakraborty *et al.*, 2008). Da RNase 7 ebenfalls als ein Ziel des IL-1 β beschrieben wurde (Mohammed *et al.*, 2011), müssen inhibitorische Signalwege im Kontext der Appendizitis überwiegen. Auch die Tatsache, daß NF- κ B unabhängige Mechanismen die RNase 7 Expression nach IL-1 β Stimulation induzieren (Mohammed *et al.*, 2011), ist im Kontext der Appendizitis schwierig einzuordnen, da dies auch für das im Rahmen der Appendizitis vermehrt exprimierte hBD-3 gilt (Pahl *et al.*, 2011). Um diese Fragestellung weiter zu klären, müssen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen analog zu den Versuchen zu hBD-1 (Chakraborty *et al.*, 2008) durchgeführt werden.

4.2 Expression der potentiellen Regulatoren der AMP-Antwort

4.2.1 Zytokine

Da zahlreiche lösliche Botenstoffe die Expression der AMPs regulieren (Dann and Eckmann, 2007; Eckmann, 2004), wurde die Expression verschiedener Zytokine und sogenannter „Pattern Recognition Rezeptoren“ untersucht. Dabei zeigte sich die Expression von IL-1 β im gesunden Appendix und bei Appendizitis mit einem kongruenten Verhalten zur Expression von hBD-2 in beiden Gruppen. Sowohl die Expression des Zytokins IL-1 β , als auch die Gen-Expression des β -Defensin hBD-2 steigen im entzündeten Appendix um das Achtfache an. Diese Beobachtung legt nahe, dass bei hoher Entzündungsaktivität mit Beteiligung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten die Produktion von hBD-2 durch IL-1 β verstärkt wird. Ähnliche Zusammenhänge zwischen IL-1 β und der hBD-2 Expression konnten für verschiedene Modellsysteme beschrieben werden (Pahl *et al.*, 2011; Wehkamp *et al.*, 2006b). Gerade für Pilzinfektionen wurde eine IL-1 β abhängige hBD-2 Antwort kürzlich verifiziert (Gross *et al.*, 2009; Hise *et al.*, 2009). Ob und in wie weit der Transkriptionsfaktor NF- κ B auch im Rahmen der Appendizitis für die hBD-2 Antwort in vergleichbarer Weise wie für die Behandlung mit Überständen von *Pseudomonas aeruginosa* (Wehkamp *et al.*, 2006b) oder die Aktivierung durch *E. coli* (Wehkamp *et al.*, 2004) ist, bleibt spekulativ. Auch wenn dies zu vermuten ist, könnte es sich wie bei der Induktion von hBD-2 durch *Fusobacterium nucleatum* in der menschlichen Schleimhaut und durch *Salmonella enteritidis* (Ogushi *et al.*, 2001) um NF- κ B unabhängige Signalwege handeln.

Die Expression von TNF α war in den drei gesunden Vergleichsgeweben etwa gleich hoch und stieg im Rahmen der Appendizitis auf das Dreifache an.

Die restlichen Zytokine, Interleukine (IL) -6, -8 und -10 waren im gesunden Ileum und Colon kaum nachweisbar. Im gesunden Appendix und noch stärker bei Appendizitis ließ sich jedoch eine deutliche Expression nachweisen, was im gesunden Appendix wieder für die Präsenz als lymphatisches Organ spricht und bei Appendizitis für die gegenseitige Stimulation proinflammatorischer Zytokine und für die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten steht.

4.2.2 Toll-like Rezeptoren

Die TLRs werden sowohl im gesunden Gewebe als auch während des akuten Entzündungsgeschehens exprimiert. Im Rahmen der akuten Appendizitis kam es zu einer signifikanten Steigerung der Expressionsrate der TLR-1, -4 und -8.

Zur Regulation der Expression der TLRs gibt es zahlreiche Arbeiten, die eine vermehrte Expression im Rahmen der Entzündungsreaktion im Allgemeinen und vor allem auch durch Interferone (Khoo *et al.*, 2011) belegen. Für den TLR-1 wurden als Liganden u. a. Lipoproteine (Alexopoulou *et al.*, 2002) beschrieben. Letztlich kommen Lipoproteine in der Zellwand aller Lebewesen, außer den Archaeen, vor, so dass der TLR-1 durch die vermehrte bakterielle Invasion im Rahmen der Appendizitis aber auch durch die allgemeine Entzündungsreaktion vermehrt exprimiert und aktiviert werden könnte. In wie weit er dabei Aktivator oder Ziel der AMPs ist (Funderburg *et al.*, 2011; Jayakumar *et al.*, 2011; Redfern *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2010), bleibt spekulativ. Es konnte aber gezeigt werden, dass eine TLR-1 Aktivierung zu einer vermehrten Expression von hBD-2 führen kann (Redfern *et al.*, 2011). In ähnlicher Weise wird der TLR-4 durch LPS aktiviert und kann sowohl zu einer vermehrten Expression von hBD-2 als auch hBD-3 führen (Kawauchi *et al.*, 2006; Redfern *et al.*, 2011; Romano Carratelli *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009). Für den TLR-8 sind ssRNA als Liganden beschrieben (Heil *et al.*, 2004; Larange *et al.*, 2009), so dass für diesen TLR vor allem eine Rolle bei der Erkennung und Aktivierung des Immunsystems gegen virale Infekte postuliert wird. In wie weit Viren eine Rolle bei der Appendizitis spielen könnten, ist durch die erhobenen Daten nicht zu klären. Vielmehr ist es vorstellbar, dass der TLR-8 im Rahmen der Appendizitis, ähnlich wie für die Antwort auf *Borrelia burgdorferi* kürzlich beschrieben (Cervantes *et al.*, 2011), mit einem der anderen TLR interagiert und die Entzündungsantwort allgemein verstärkt.

4.2.3 NOD2

In der Appendizitis kommt es im Vergleich zum nicht entzündeten Appendix zu einem signifikanten Anstieg der NOD2 Expression. NOD2 ist ein Rezeptor für das Muramyl-Dipeptid, ein Bestandteil der Zellmembran sowohl Gram-positiver als auch Gram-negativer Bakterien. Vor allem für die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen konnte gezeigt werden, dass NOD2 eine entscheidende Funktion in der Bekämpfung

intrazellulärer Bakterien bzw. der Verhinderung der Invasion der Bakterien in das Epithel hat (Cario, 2005; Lipinski *et al.*, 2009; Peyrin-Biroulet and Chamaillard, 2007; Wehkamp *et al.*, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass NOD2 in der Lage ist, die hBD-2 Expression zu induzieren (Voss *et al.*, 2006). Für die anderen Defensine gibt es bisher nur indirekte Korrelationen zwischen NOD2 und dessen Expression (Ramasundara *et al.*, 2009; Simms *et al.*, 2008; Wehkamp *et al.*, 2008; Wehkamp *et al.*, 2009; Zilbauer *et al.*, 2011).

4.3 Erfassung der Mikrobiota während der Appendizitis

Im Rahmen der Appendizitis konnte eine gesteigerte bakterielle Anreicherung (Richness) und Diversität (Diversity) der mikrobiellen Flora nachgewiesen werden. Zunehmend wird davon ausgegangen, dass die intestinale bakterielle Flora wichtige Interaktionen mit dem Epithel eingeht. Diese Interaktionen sind kaum verstanden, aber es konnte gezeigt werden, dass Veränderungen in der Zusammensetzung der bakteriellen Flora mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vergesellschaftet sind (Ott *et al.*, 2008; Ott *et al.*, 2004b; Sjogren *et al.*, 2009). Auch wenn die Mechanismen des bakteriellen-epithelialen Wechselspiels kaum verstanden sind, kann davon ausgegangen werden, dass sowohl die Zusammensetzung der bakteriellen Flora die Gesundheit des Gesamtorganismus beeinflusst, als auch reziprok Krankheiten des Gesamtorganismus die bakterielle Flora verändern.

Es könnte also sein, dass die vermehrte bakterielle Diversität und Anreicherung während der Appendizitis zur Ausbildung der Entzündung führt. Diese Theorie würde die bisherigen Annahmen zur Rolle von Bakterien in der Pathophysiologie der Appendizitis unterstützen.

Diese geht davon aus, dass durch eine Blockade der Appendixöffnung mit Darminhalt, der aus dem Caecum in den Appendix tritt, nicht wieder abfließen kann. Die damit wie in einem Inkubator eingeschlossene Darmflora könnte sich stark vermehren und in ihrer prozentualen Zusammensetzung verändern. Dementsprechend wurden verschiedene mikrobiologische Spezies im Bereich des entzündlich veränderten Appendix bereits nachgewiesen. Eine kürzlich erschienene Arbeit konnte eine zentrale Rolle von *Fusobacterium nucleatum/necrophorum* in der Appendizitis postulieren (Swidsinski *et al.*, 2011), wobei dies von anderen Arbeitsgruppen bisher noch nicht bestätigt wurde und bis dahin ein spezifischer „Appendizitiskeim“ nicht isoliert werden konnte (Lin *et al.*, 2006) und eher davon

ausgegangen wurde, dass verschiedene Keime beteiligt sind. Die genaue mikrobiologische Zusammensetzung ist weitgehend unbekannt, wobei im Vergleich zum gesunden Kolon die relative Häufigkeit von Clostridien, Enterokokken, *Entereobacter cloacae*, Laktobazillen, Eubakterien, *Bacteroides vulgatus* und *bacteroides distasonis* im entzündlichen Appendix geringer ist.

Die in dieser Arbeit erhobenen Beobachtungen zur bakteriellen Flora können keine Aussage zur Rolle von *Fusobacterium nucleatum/necrophorum* in der Appendizitis machen, legen aber nahe, dass die vermehrte bakterielle Diversität und Anreicherung pathophysiologische Ursache sind.

5 Zusammenfassung

Die akute Appendizitis ist in jüngerem Patientenalter die häufigste Entzündung im Bereich des Abdomens und somit eines der häufigsten Ursachen für Abdominalschmerz. Unbehandelt oder zu spät therapierte Fälle weisen eine hohe Letalität auf. Die Blockade des Appendixlumens durch hervorgedrunenen Darminhalt aus dem Caecum lässt vermuten, dass die Appendizitis eine lymphatische Gewebereaktion auf enterische Pathogene ist. Nicht jedes Individuum macht im Laufe seines Lebens eine akute Appendizitis durch, so dass die Vermutung nahe legt, dass bestimmte Keime für die Pathogenese dieser Erkrankung verantwortlich seien. Auch der angeborenen Abwehr, vor allem den Antimikrobiellen Peptiden, werden im Rahmen der Entzündungsreaktion und zur Begrenzung des Ausmaßes der bakteriellen Invasion vermehrt Funktionen zugesprochen.

Antimikrobielle Peptide werden von verschiedenen Epithelzellen und Granulozyten gebildet und sind dem angeborenen Immunsystem zugeordnet. Eine wichtige Untergruppe stellen die Defensine dar. Im Dünndarm werden die beiden „Humanen alpha Defensine“ (HD) -5 und -6 gebildet. Die „humanen beta Defensine“ (hBD) -1, -2 und -3 werden im Dickdarm und auf der Haut exprimiert, wobei hBD-2 und hBD-3 durch die inflammatorischen Zytokine, Interleukin (IL-1 β) und dem Tumornekrosefaktor alpha (TNF α), induziert werden können. Defensine bewirken eine Schädigung der Zellwand von Mikroorganismen. Sie haben ein breites Wirkspektrum gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien, Mycobakterien, Pilze und Viren. Das Peptid RNase 7 wird hauptsächlich von der Haut exprimiert und zeigt hohe antimikrobielle Aktivität gegen *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli*.

Um eine mögliche pathophysiologische Funktion zu verifizieren, wurde die Expression der Antimikrobiellen Peptide und ihrer Regulatoren im Rahmen der akuten Appendizitis untersucht.

Dazu wurden Gewebeproben aus operativ entnommenen Appendices von 38 Patienten untersucht. 24 Proben aus entzündlich veränderten Appendices wurden 14 Proben aus gesundem Appendixgewebe in ihrem Gen-Expressionsverhalten gegenübergestellt. Zusätzlich wurde gesundes Vergleichsgewebe aus anderen Darmabschnitten, je 23 Proben aus dem gesunden Ileum und dem gesunden Colon

untersucht. Aus allen Abschnitten wurde RNA isoliert und nach reverser Transkription mittels quantitativer real-time PCR (Polymerase Kettenreaktion) die Genexpression von Antimikrobiellen Peptiden, Zytokinen und TLR bestimmt.

Die Genexpression des β -Defensins hBD-1 wurde in den gesunden Vergleichsgeweben (Ileum, Colon und gesundem Appendix) auf ähnlich hohem Expressionsniveau nachgewiesen. Interessanterweise kam es im Rahmen der Appendizitis zu einer Herabregulation der hBD-1 Expression. Im Unterschied dazu wurden die beiden β -Defensine hBD-2 und hBD-3 nur in entzündetem Gewebe nachgewiesen, wobei die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α durch ihr kongruentes Verhalten als mögliche Stimulatoren für die Gen-Expression dieser beiden β -Defensine nachgewiesen wurden.

Die hohe basale Expression von IL-1 β und IL-8 im gesunden Appendix und deren steigende Expression bei akuter Appendizitis bestätigt zum Einen die Ergebnisse vorausgegangener Untersucher und zum Anderen legen diese Befunde nahe, dass im Appendix ein Entzündungsschwerpunkt liegt und hier Defensine bei Bedarf induziert werden können.

Die α -Defensine HNP1-3 wurden, im Vergleich zum gesunden Ileum und Colon, wo sie kaum exprimiert wurden, sowohl im gesunden als auch mit steigenden Werten im entzündeten Appendix gefunden.

Die Vermutung, dass bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) eine zentrale Rolle in der Entwicklung der Appendizitis einnimmt, wird durch das Expressionsverhalten des Toll-like-Rezeptors (TLR-4), der durch bakterielles LPS aktiviert wird, unterstützt. Im entzündeten Appendix verdoppelt sich seine Gen-Expression.

Die Analyse eines größeren Spektrums von inflammatorischen Botenstoffen und Rezeptoren mittels TaqMan Array verifizierte die Einzelgenanalyse und erbrachte den Nachweis einer vermehrten Expression von NOD2. Dieser Sensor für Muramyl-Dipeptid ist vor allem auch für die Abwehr der bakteriellen Invasion wichtig, so dass im Zusammenspiel mit den TLRs hier offensichtlich eine Aktivierung des angeborenen und erworbenen Immunsystems im Rahmen der Appendizitis mit dem Ziel der Terminierung einer bakteriellen Entzündung stattfindet.

Im Einklang mit dieser Hypothese konnte die Analyse der Microbiota eine erhöhte bakterielle Diversität und Anreicherung nachweisen.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass im Rahmen der Appendizitis eine differentielle angeborene Immunantwort mit vermehrter Expression von α -Defensinen, hBD-2 und hBD-3 und einer Herabregulation von hBD-1 stattfindet.

6 Literaturverzeichnis

Agerberth B, Gudmundsson GH (2006). Host antimicrobial defence peptides in human disease. *Curr Top Microbiol Immunol* **306**: 67-90.

Albanesi C, Fairchild HR, Madonna S, Scarponi C, De Pita O, Leung DY *et al* (2007). IL-4 and IL-13 negatively regulate TNF- α - and IFN- γ -induced beta-defensin expression through STAT-6, suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1, and SOCS-3. *J Immunol* **179**: 984-92.

Alexopoulou L, Thomas V, Schnare M, Lobet Y, Anguita J, Schoen RT *et al* (2002). Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. *Nat Med* **8**: 878-84.

Beckloff N, Diamond G (2008). Computational analysis suggests beta-defensins are processed to mature peptides by signal peptidase. *Protein Pept Lett* **15**: 536-40.

Boman HG (1991). Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell* **65**: 205-7.

Cario E (2005). Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* **54**: 1182-93.

Cario E (2008). Innate immune signalling at intestinal mucosal surfaces: a fine line between host protection and destruction. *Curr Opin Gastroenterol* **24**: 725-32.

Casanova JL, Abel L, Quintana-Murci L (2011). Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. *Annu Rev Immunol* **29**: 447-91.

Cervantes JL, Dunham-Ems SM, La Vake CJ, Petzke MM, Sahay B, Sellati TJ *et al* (2011). Phagosomal signaling by *Borrelia burgdorferi* in human monocytes involves Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR8 cooperativity and TLR8-mediated induction of IFN- β . *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 3683-8.

Chakraborty K, Ghosh S, Koley H, Mukhopadhyay AK, Ramamurthy T, Saha DR *et al* (2008). Bacterial exotoxins downregulate cathelicidin (hCAP-18/LL-37) and human beta-defensin 1 (hBD-1) expression in the intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol* **10**: 2520-37.

Chen K, Huang J, Gong W, Iribarren P, Dunlop NM, Wang JM (2007). Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer. *Int Immunopharmacol* **7**: 1271-85.

Dann SM, Eckmann L (2007). Innate immune defenses in the intestinal tract. *Curr Opin Gastroenterol* **23**: 115-20.

Dominguez-Bello MG, Blaser MJ, Ley RE, Knight R (2011). Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing. *Gastroenterology* **140**: 1713-9.

Eckmann L (2004). Innate immunity and mucosal bacterial interactions in the intestine. *Curr Opin Gastroenterol* **20**: 82-8.

Frye M, Bargon J, Lembcke B, Wagner TO, Gropp R (2000). Differential expression of human alpha- and beta-defensins mRNA in gastrointestinal epithelia. *Eur J Clin Invest* **30**: 695-701.

Funderburg NT, Jadhowsky JK, Lederman MM, Feng Z, Weinberg A, Sieg SF (2011). The Toll-like receptor 1/2 agonists Pam(3) CSK(4) and human beta-defensin-3 differentially induce interleukin-10 and nuclear factor-kappaB signalling patterns in human monocytes. *Immunology* **134**: 151-60.

Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF *et al* (1985). Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* **76**: 1427-35.

Gomes NC, Fagbola O, Costa R, Rumjanek NG, Buchner A, Mendona-Hagler L *et al* (2003). Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. *Appl Environ Microbiol* **69**: 3758-66.

Green JM (2008). When is faster better? Operative timing in acute care surgery. *Curr Opin Crit Care* **14**: 423-7.

Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hanneschlager N, Endres S *et al* (2009). Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* **459**: 433-6.

Harder J, Glaser R, Schroder JM (2007). The role and potential therapeutical applications of antimicrobial proteins in infectious and inflammatory diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **7**: 75-82.

Harder J, Schroder JM (2002). RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem* **277**: 46779-84.

Harder J, Schroder JM (2005a). Antimicrobial peptides in human skin. *Chem Immunol Allergy* **86**: 22-41.

Harder J, Schroder JM (2005b). Psoriatic scales: a promising source for the isolation of human skin-derived antimicrobial proteins. *J Leukoc Biol* **77**: 476-86.

Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S *et al* (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**: 1526-9.

Hise AG, Tomalka J, Ganesan S, Patel K, Hall BA, Brown GD *et al* (2009). An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Host Microbe* **5**: 487-97.

Hollox EJ, Barber JC, Brookes AJ, Armour JA (2008). Defensins and the dynamic genome: what we can learn from structural variation at human chromosome band 8p23.1. *Genome Res* **18**: 1686-97.

Hosaka Y, Koslowski M, Nuding S, Wang G, Schlee M, Schafer C *et al* (2008). Antimicrobial host defense in the upper gastrointestinal tract. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **20**: 1151-8.

Jayakumar A, Castilho TM, Park E, Goldsmith-Pestana K, Blackwell JM, McMahon-Pratt D (2011). TLR1/2 activation during heterologous prime-boost vaccination (DNA-MVA) enhances CD8+ T Cell responses providing protection against *Leishmania* (Viannia). *PLoS Negl Trop Dis* **5**: e1204.

Jones DE, Bevins CL (1992). Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J Biol Chem* **267**: 23216-25.

Jones DE, Bevins CL (1993). Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. *FEBS Lett* **315**: 187-92.

Kawauchi K, Yagihashi A, Tsuji N, Uehara N, Furuya D, Kobayashi D *et al* (2006). Human beta-defensin-3 induction in *H. pylori*-infected gastric mucosal tissues. *World J Gastroenterol* **12**: 5793-7.

Khoo JJ, Forster S, Mansell A (2011). Toll-like receptors as interferon-regulated genes and their role in disease. *J Interferon Cytokine Res* **31**: 13-25.

Kiehne K, Fincke A, Brunke G, Lange T, Folsch UR, Herzig KH (2007). Antimicrobial peptides in chronic anal fistula epithelium. *Scand J Gastroenterol* **42**: 1063-9.

Kota S, Sabbah A, Chang TH, Harnack R, Xiang Y, Meng X *et al* (2008). Role of human beta-defensin-2 during tumor necrosis factor-alpha/NF-kappaB-mediated innate antiviral response against human respiratory syncytial virus. *J Biol Chem* **283**: 22417-29.

Kubler I, Stange EF, Fellermann K, Wehkamp J (2006). [Defensins: endogenous antibiotics as a central part of innate immunity]. *Dtsch Med Wochenschr* **131**: 1960-4.

Lamps LW (2004). Appendicitis and infections of the appendix. *Semin Diagn Pathol* **21**: 86-97.

Larange A, Antonios D, Pallardy M, Kerdine-Romer S (2009). TLR7 and TLR8 agonists trigger different signaling pathways for human dendritic cell maturation. *J Leukoc Biol* **85**: 673-83.

Lin WJ, Lo WT, Chu CC, Chu ML, Wang CC (2006). Bacteriology and antibiotic susceptibility of community-acquired intra-abdominal infection in children. *J Microbiol Immunol Infect* **39**: 249-54.

Lipinski S, Till A, Sina C, Arlt A, Grasberger H, Schreiber S *et al* (2009). DUOX2-derived reactive oxygen species are effectors of NOD2-mediated antibacterial responses. *J Cell Sci* **122**: 3522-30.

Lyons SR, Griffen AL, Leys EJ (2000). Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. *J Clin Microbiol* **38**: 2362-5.

Mohammed I, Yeung A, Abedin A, Hopkinson A, Dua HS (2011). Signalling pathways involved in ribonuclease-7 expression. *Cell Mol Life Sci* **68**: 1941-52.

Musso G, Gambino R, Cassader M (2011). Interactions between gut microbiota and host metabolism predisposing to obesity and diabetes. *Annu Rev Med* **62**: 361-80.

Nagy-Szakal D, Kellermayer R (2011). The remarkable capacity for gut microbial and host interactions. *Gut Microbes* **2**: 178-82.

O'Neil DA (2003). Regulation of expression of beta-defensins: endogenous enteric peptide antibiotics. *Mol Immunol* **40**: 445-50.

Ogushi K, Wada A, Niidome T, Mori N, Oishi K, Nagatake T *et al* (2001). *Salmonella enteritidis* *FliC* (flagella filament protein) induces human beta-defensin-2 mRNA production by Caco-2 cells. *J Biol Chem* **276**: 30521-6.

Ott SJ, Kuhbacher T, Musfeldt M, Rosenstiel P, Hellmig S, Rehman A *et al* (2008). Fungi and inflammatory bowel diseases: Alterations of composition and diversity. *Scand J Gastroenterol* **43**: 831-41.

Ott SJ, Musfeldt M, Ullmann U, Hampe J, Schreiber S (2004a). Quantification of intestinal bacterial populations by real-time PCR with a universal primer set and minor groove binder probes: a global approach to the enteric flora. *J Clin Microbiol* **42**: 2566-72.

Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O, Folsch UR *et al* (2004b). Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* **53**: 685-93.

Otte JM, Kiehne K, Herzig KH (2003). Antimicrobial peptides in innate immunity of the human intestine. *J Gastroenterol* **38**: 717-26.

Pahl R, Brunke G, Steubesand N, Schubert S, Bottner M, Wedel T *et al* (2011). IL-1 β and ADAM17 are central regulators of β -defensin expression in *Candida* esophagitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **300**: G547-53.

Pazgier M, Hoover DM, Yang D, Lu W, Lubkowski J (2006). Human beta-defensins. *Cell Mol Life Sci* **63**: 1294-313.

Peterfi Z, Kovacs K, Antal A, Kocsis B (2006). Anti-lipopolysaccharide antibodies in acute appendicitis detected by ELISA. *Apmis* **114**: 265-9.

Peters BM, Shirtliff ME, Jabra-Rizk MA (2011). Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathog* **6**: e1001067.

Peyrin-Biroulet L, Chamaillard M (2007). NOD2 and defensins: translating innate to adaptive immunity in Crohn's disease. *J Endotoxin Res* **13**: 135-9.

Preidis GA, Versalovic J (2009). Targeting the human microbiome with antibiotics, probiotics, and prebiotics: gastroenterology enters the metagenomics era. *Gastroenterology* **136**: 2015-31.

Radford-Smith GL (2008). What is the importance of appendectomy in the natural history of IBD? *Inflamm Bowel Dis* **14 Suppl 2**: S72-4.

Ramasundara M, Leach ST, Lemberg DA, Day AS (2009). Defensins and inflammation: the role of defensins in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* **24**: 202-8.

Redfern RL, Reins RY, McDermott AM (2011). Toll-like receptor activation modulates antimicrobial peptide expression by ocular surface cells. *Exp Eye Res* **92**: 209-20.

Ringel Y, Carroll IM (2009). Alterations in the intestinal microbiota and functional bowel symptoms. *Gastrointest Endosc Clin N Am* **19**: 141-50, vii.

Rivera-Chavez FA, Wheeler H, Lindberg G, Munford RS, O'Keefe GE (2003). Regional and systemic cytokine responses to acute inflammation of the vermiform appendix. *Ann Surg* **237**: 408-16.

Romano Carratelli C, Mazzola N, Paolillo R, Sorrentino S, Rizzo A (2009). Toll-like receptor-4 (TLR4) mediates human beta-defensin-2 (HBD-2) induction in response to *Chlamydia pneumoniae* in mononuclear cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* **57**: 116-24.

Round JL, Mazmanian SK (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* **9**: 313-23.

Salzman NH (2010). Paneth cell defensins and the regulation of the microbiome: detente at mucosal surfaces. *Gut Microbes* **1**: 401-6.

Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schafer-Korting M, Korting HC (2005). Human defensins. *J Mol Med (Berl)* **83**: 587-95.

Schroder JM, Harder J (2006). Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell Mol Life Sci* **63**: 469-86.

Schroeder BO, Stange EF, Wehkamp J (2011a). Waking the wimp: Redox-modulation activates human beta-defensin 1. *Gut Microbes* **2**: 262-6.

Schroeder BO, Wu Z, Nuding S, Groscurth S, Marcinowski M, Beisner J *et al* (2011b). Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human beta-defensin 1. *Nature* **469**: 419-23.

Schwieger F, Tebbe CC (1998). A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl Environ Microbiol* **64**: 4870-6.

Shanahan F (2009). Therapeutic implications of manipulating and mining the microbiota. *J Physiol* **587**: 4175-9.

Shiohara M, Taniguchi S, Masumoto J, Yasui K, Koike K, Komiyama A *et al* (2002). ASC, which is composed of a PYD and a CARD, is up-regulated by inflammation and apoptosis in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* **293**: 1314-8.

Simms LA, Doecke JD, Walsh MD, Huang N, Fowler EV, Radford-Smith GL (2008). Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut*.

Simpson J, Samaraweera AP, Sara RK, Lobo DN (2008). Acute appendicitis--a benign disease? *Ann R Coll Surg Engl* **90**: 313-6.

Sjogren YM, Tomicic S, Lundberg A, Bottcher MF, Bjorksten B, Sverremark-Ekstrom E *et al* (2009). Influence of early gut microbiota on the maturation of childhood mucosal and systemic immune responses. *Clin Exp Allergy* **39**: 1842-51.

Soehnlein O, Kai-Larsen Y, Frithiof R, Sorensen OE, Kenne E, Scharffetter-Kochanek K *et al* (2008). Neutrophil primary granule proteins HBP and HNP1-3 boost bacterial phagocytosis by human and murine macrophages. *J Clin Invest* **118**: 3491-502.

Spencer JD, Schwaderer AL, Dirosario JD, McHugh KM, McGillivray G, Justice SS *et al* (2011). Ribonuclease 7 is a potent antimicrobial peptide within the human urinary tract. *Kidney Int* **80**: 174-80.

Strominger JL (2009). Animal antimicrobial peptides: ancient players in innate immunity. *J Immunol* **182**: 6633-4.

Sugawara Y, Uehara A, Fujimoto Y, Kusumoto S, Fukase K, Shibata K *et al* (2006). Toll-like receptors, NOD1, and NOD2 in oral epithelial cells. *J Dent Res* **85**: 524-9.

Sumikawa Y, Asada H, Hoshino K, Azukizawa H, Katayama I, Akira S *et al* (2006). Induction of beta-defensin 3 in keratinocytes stimulated by bacterial lipopeptides through toll-like receptor 2. *Microbes Infect* **8**: 1513-21.

Swidsinski A, Dorffel Y, Loening-Baucke V, Theissig F, Ruckert JC, Ismail M *et al* (2011). Acute appendicitis is characterised by local invasion with *Fusobacterium nucleatum/necrophorum*. *Gut* **60**: 34-40.

Voss E, Wehkamp J, Wehkamp K, Stange EF, Schroder JM, Harder J (2006). NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. *J Biol Chem* **281**: 2005-11.

Watson Ng WS, Hampartzoumian T, Lloyd AR, Grimm MC (2007). A murine model of appendicitis and the impact of inflammation on appendiceal lymphocyte constituents. *Clin Exp Immunol* **150**: 169-78.

Wehkamp J, Chu H, Shen B, Feathers RW, Kays RJ, Lee SK *et al* (2006a). Paneth cell antimicrobial peptides: topographical distribution and quantification in human gastrointestinal tissues. *FEBS Lett* **580**: 5344-50.

Wehkamp J, Fellermann K, Herrlinger KR, Bevins CL, Stange EF (2005). Mechanisms of disease: defensins in gastrointestinal diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* **2**: 406-15.

Wehkamp J, Harder J, Wehkamp K, Wehkamp-von Meissner B, Schlee M, Enders C *et al* (2004). NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by Escherichia coli Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect Immun* **72**: 5750-8.

Wehkamp J, Koslowski M, Wang G, Stange EF (2008). Barrier dysfunction due to distinct defensin deficiencies in small intestinal and colonic Crohn's disease. *Mucosal Immunol* **1 Suppl 1**: S67-74.

Wehkamp J, Schaubert J, Stange EF (2007a). Defensins and cathelicidins in gastrointestinal infections. *Curr Opin Gastroenterol* **23**: 32-8.

Wehkamp J, Schmid M, Stange EF (2007b). Defensins and other antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* **23**: 370-8.

Wehkamp J, Stange EF (2008). Is there a role for defensins in IBD? *Inflamm Bowel Dis* **14 Suppl 2**: S85-7.

Wehkamp J, Stange EF, Fellermann K (2009). Defensin-immunology in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin Biol* **33 Suppl 3**: S137-44.

Wehkamp K, Schwichtenberg L, Schroder JM, Harder J (2006b). Pseudomonas aeruginosa- and IL-1beta-mediated induction of human beta-defensin-2 in keratinocytes is controlled by NF-kappaB and AP-1. *J Invest Dermatol* **126**: 121-7.

Wu J, Meng Z, Jiang M, Zhang E, Trippier M, Broering R *et al* (2010). Toll-like receptor-induced innate immune responses in non-parenchymal liver cells are cell type-specific. *Immunology* **129**: 363-74.

Wu M, McClellan SA, Barrett RP, Zhang Y, Hazlett LD (2009). Beta-defensins 2 and 3 together promote resistance to Pseudomonas aeruginosa keratitis. *J Immunol* **183**: 8054-60.

Yamamoto T, Umegae S, Kitagawa T, Matsumoto K (2005). Intraperitoneal cytokine productions and their relationship to peritoneal sepsis and systemic inflammatory markers in patients with inflammatory bowel disease. *Dis Colon Rectum* **48**: 1005-15.

Yang D, Liu ZH, Tewary P, Chen Q, de la Rosa G, Oppenheim JJ (2007). Defensin participation in innate and adaptive immunity. *Curr Pharm Des* **13**: 3131-9.

Zaalouk TK, Bajaj-Elliott M, George JT, McDonald V (2004). Differential regulation of beta-defensin gene expression during *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun* **72**: 2772-9.

Zilbauer M, Jenke A, Wenzel G, Goedde D, Postberg J, Phillips AD *et al* (2011). Intestinal alpha-defensin expression in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **17**: 2076-86.

Zou H, Harrington JJ, Sugumar A, Klatt KK, Smyrk TC, Ahlquist DA (2007). Detection of colorectal disease by stool defensin assay: an exploratory study. *Clin Gastroenterol Hepatol* **5**: 865-8.

7 Danksagung

Die Dissertation wurde an der Klinik für Innere Medizin I der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt.

Ich danke allen, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Alexander Arlt für den Vorschlag dieser Arbeit und die kompetente und gewissenhafte Betreuung. Für die ständige Hilfsbereitschaft und Geduld, die er mir entgegengebracht hat und für den persönlichen Einsatz und die zuletzt mühevollen Arbeit des Korrekturlesens bin ich ihm zu großem Dank verpflichtet, so auch Frau dipl. Biol. Gabriele Brunke für die hervorragende Betreuung.

Zu Dank verpflichtet bin ich ebenfalls Herrn Prof. Dr. med. Stefan Schreiber, Direktor der I. Medizinischen Klinik der Universitätsklinik Schleswig-Holstein, Campus Kiel für die Bereitstellung des Labors und die Möglichkeit, meine Experimente dort durchführen zu können. Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und für viele wertvolle Anregungen.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern und meinen beiden Brüdern bedanken für die uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung. Ganz besonders danke ich meinem Vater, Ibrahim Aloji, der mir finanziell und mit aufopferungsvoller Hingabe das Medizinstudium ermöglicht hat und mich über die Jahre mit bestem Rat begleitet hat.

9 Anhang

9.1 Erklärung Ethik

Die Probenentnahme und Gewebeuntersuchung wurde von der Ethikkommission der Universität Kiel genehmigt (Code AZ.: A158/01).

9.2 Erklärung Doktorarbeit

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass meine Dissertation mit dem Thema:

„Analyse der Expression von antimikrobiellen Peptiden und deren Regulatoren bei der akuten Appendizitis“,

abgesehen von Ratschlägen meines Doktorvaters und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist und dass ich außer den in der Arbeit aufgeführten keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe und dass meine Arbeit bisher weder ganz noch in Teilen keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat.

Meine Arbeit ist noch nicht veröffentlicht.

Ich widerspreche nach §5, Abs. 2k der Promotionsordnung der Teilnahme von Zuhörern an der mündlichen Doktorprüfung.