

Diplomarbeit

DAS MIKROBIOM DER NEONATALEN APPENDIX

eingereicht von

Klaus Deuretzbacher

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor(in) der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der/am

Universitätsklinik für Kinder- und Jugendchirurgie

Institut für Pathologie

unter der Anleitung von

Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. med. univ. Georg Singer

Univ.-Prof. Dr. med. univ. Gregor Gorkiewicz

Univ.-Prof. Dr. Holger Till

Graz, am 07.05.2015

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 07.05.2015

Klaus Deuretzbacher, eh.

Danksagungen

Das Schreiben einer Diplomarbeit ist ein zeitintensives, anstrengendes und kräfteaubendes Projekt. Ohne die Mithilfe engagierter Lehrender und der Motivation durch Familie und Freunde würde wohl jeder früher oder später aufgeben. Dank der Hilfe meines Umfeldes konnte ich diese Arbeit rasch und ohne Probleme fertigstellen, dafür würde ich mich gerne bedanken.

Mein größter Dank gilt meinem Betreuer, Herr Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. med. univ. Georg Singer von der klinischen Abteilung für allgemeine Kinder- und Jugendchirurgie, der mir nicht nur ein interessantes Thema zum Bearbeiten gab, sondern auch stets für Fragen und Anregungen zur Verfügung stand, nützliche Ratschläge für die Bearbeitung der Diplomarbeit lieferte, den Fortschritt der Arbeit kontinuierlich überprüfte und mit Verbesserungsvorschlägen aufwertete und bei der Auswertung der Ergebnisse hilfreich assistierte. Ohne die Hilfe einer so engagierten Ansprechperson wäre diese Diplomarbeit nie rechtzeitig in der hier vorliegenden Form fertiggestellt worden. Außerdem möchte ich mich noch bei den Mitarbeitern des Pathologischen Instituts der Medizinischen Universität Graz bedanken, insbesondere bei Herrn Univ. Prof. Priv.-Doz. Dr. med. univ. Gregor Gorkiewicz und Herrn Mag. Dr. phil. Karl Kashofer, die mir einerseits einen Einblick in die Mikrobiomforschung ermöglichten, mir andererseits bei der Auswertung und Interpretation der Ergebnisse zur Seite standen.

Des Weiteren gilt mein Dank auch meinem privatem Umfeld, unter anderem meiner Freundin Stefanie Lamprecht, die sich wiederholt als Lektorin zur Verfügung stellte und mich in tachinierenden Phasen stets motivieren konnte noch weiterzuschreiben, sowie den unzähligen Freunden und Familienmitgliedern, die sich meine endlosen Vorträge über Bakterienverteilungen und PCR-Analysen gefallen ließen und somit ebenfalls einen wesentlichen Anteil zur Vollendung dieser Arbeit beitrugen.

Schließlich noch vielen Dank an die Medizinische Universität Graz und deren Mitarbeiter und Lehrende für die mir zuteil gewordene Ausbildung. Ich bin mir sicher, dass sie mir in Zukunft wertvolle Dienste erweisen wird.

Ich danke Euch allen vielmals!

Zusammenfassung

Hintergrund: Ziel dieser Studie war die Erfassung des Mikrobioms in der neonatalen Appendix und eine Verbesserung des Verständnisses der Entwicklung des Mikrobioms in der neonatalen Phase. Der Begriff Mikrobiom bezeichnet eine „ökologische Gemeinschaft von symbiotischen und pathogenen Mikroorganismen, die buchstäblich unsere Körperoberfläche teilen“. Die so beschriebene natürliche Mikroflora, die vor allem auf der Haut, der Schleimhaut und im GIT zu finden ist, ist von besonderer Bedeutung für die Gesundheit beziehungsweise für die Entstehung von Krankheiten und daher immer mehr in den Fokus der Forschung gerückt. Noch wenig ist über die Entwicklung des Mikrobioms im Neugeborenen-Alter bekannt. Einige Studien hatten sich bereits mit dem Mikrobiom des Gastrointestinaltrakts bei Neugeborenen und Säuglingen auseinandergesetzt, meistens wurden aber nur Stuhluntersuchungen durchgeführt und somit nur die luminalen, nicht aber die Mucosa-assoziierten Bakterien erfasst und somit ein wesentlicher Teil des Mikrobioms vernachlässigt. Neueste Erkenntnisse zeigten, dass die Appendix eine konservierende Funktion nützlicher Darmbakterien einnehmen könnte, die im Falle einer Depletion der gastrointestinalen Flora durch zum Beispiel Durchfallerkrankungen mittels Abschilferung zu einer Wiederbesiedelung des Darmes führen können. Das Mikrobiom der Appendix nimmt somit eine interessante Rolle für das Verständnis des physiologischen Mikrobioms des unteren Gastrointestinaltrakts ein.

Methoden: Um die Entwicklung des Mikrobioms besser verstehen zu können, wurde in der hier durchgeführten Studie das Mikrobiom von 56 Proben entzündungsfreier Appendices von Frühgeborenen bis Kindern in Schulalter mittels neuer Sequenzierungs-Methoden analysiert. Die Proben wurden nach Gewicht und OP-Zeitpunkt in vier Gruppen unterteilt, wobei die erste Gruppe Appendices umfasste, die noch am Tag der Geburt entfernt wurden und die vierte und letzte Gruppe aus Appendices von 5 bis 10-jährigen bestand. In der statistischen Auswertung zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen diesen Gruppen im Bezug auf die bakterielle Verteilung. Zudem konnte die Sterilität der neonatalen Appendix kurz nach der Geburt indirekt gezeigt werden.

Die vorliegende Arbeit bietet einen Überblick über die bakterielle Verteilung in der neonatalen Appendix beziehungsweise in der Appendix von Kindern und weist auf deren Unterschiede hin.

Abstract

Background: This study aimed to improve our understanding of the microbiome's development in the neonatal period and to assess the microbial composition of the neonatal appendix. The microbiome is defined as "ecological community of symbiotic and pathogen microorganisms, that literally share our body surface". This natural microflora, which can mostly be found on the skin, the mucosa and in the gastrointestinal tract doesn't only strongly influence human health but also triggers certain diseases. This fact has led to an increasing interest in the microbiome, its development and its role in sustaining health and causing disease. However, there is still scarce data concerning the microbiome development during the neonatal period. Some studies have already described the gastrointestinal microbiome in neonates and infants. Nevertheless, these studies mostly based their findings on samples of feces, thus only recording the luminal but disregarding the mucosa-associated bacteria and therefore neglecting an important part of the gastrointestinal microbiome. Newest findings have shown an important conservatory function of the appendix for beneficial gut-bacteria as a "safe-house". Due to its anatomy and certain secretory qualities the appendix remains unaffected in case of severe diarrhoea and loss of the bacterial population in the gut. Therefore, it can facilitate the re-inoculation of the colon promoting recovery and its microbiome is crucial for understanding the physiological microbiome of the lower digestive tract.

Methods: To improve our understanding of the microbiome's development in the neonatal period and to assess the microbial composition of the neonatal appendix, the microbiome of 56 samples of inflammation-free appendices from preterm newborns to school-aged children was assessed using next-generation sequencing. Samples were grouped according to the weight and age of the children at time of surgery. The first group consisted of samples from appendices taken from newborns on the day of their birth, the fourth and last group consisting of appendices from school-aged children. Statistical analysis showed significant differences in the microbial composition of the groups. Additionally, the sterility of neonatal appendices shortly after birth could be shown indirectly.

The present study offers an overview of the microbial composition in the neonatal appendix and the appendix of school-aged children, showing the differences between early development stages of the appendiceal microbiome.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	ii
Zusammenfassung	iii
Abstract	iv
Inhaltsverzeichnis	v
Glossar und Abkürzungen	vii
Abbildungsverzeichnis	viii
Tabellenverzeichnis	ix
1 Einleitung	10
1.1.1 Das Mikrobiom	10
1.1.2 Definition	10
1.1.3 Tools für die Identifikation des Mikrobioms	11
1.2 Das Mikrobiom des Gastrointestinaltrakts	13
1.2.1 Aufbau des Mikrobioms im GIT des Gesunden	14
1.3 Die Appendix	22
1.3.1 Anatomie der Appendix	22
1.3.2 Funktion der Appendix	22
1.3.3 Das Mikrobiom der Appendix	26
2 Material und Methoden	29
2.1 Probenmaterial	29
2.2 Mikrobiom Analyse	32
2.2.1 DNA Isolation und PCR Amplifikation	32
2.2.2 Sequenz-Analyse	33
3 Ergebnisse	34
3.1 Überblick über die Verteilung	34
3.2 ADONIS-Test	35
3.3 Verteilung der wichtigsten Bakterien in den Gruppen	40
3.3.1 Verteilung der Bakterien in Gruppe (1)	41
3.3.2 Verteilung der Bakterien in Gruppe (2)	41
3.3.3 Verteilung der Bakterien in Gruppe (3)	42
3.3.4 Verteilung der Bakterien in Gruppe (4)	42
3.3.5 Verteilung der Bakterien in den Leerwert-Gruppen	42
3.4 Änderung der bakteriellen Verteilung	44
3.4.1 Verteilung der Proteobakterien	44

3.4.2	Verteilung der <i>Bacteroidetes</i>	45
3.4.3	Verteilung der <i>Firmicutes</i>	46
3.4.4	Verteilung der <i>Actinobakterien</i>	47
3.4.5	Verteilung der seltener vorkommenden Bakterien	48
4	Diskussion.....	49
4.1	Sterilität der neonatalen Appendix	49
4.2	Entwicklung des Mikrobioms in der neonatalen Appendix.....	50
4.3	Entbindungsart hat keine Auswirkung auf das Mikrobiom der Appendix .	51
4.4	Mikrobiom der Appendix von Kindern.....	51
4.5	Rolle der Fusobakterien für die Appendicitis	52
4.6	Weiterführende Untersuchungen	53
5	Literaturverzeichnis	53

Glossar und Abkürzungen

ADONIS	Test zum Vergleich von Kategorien
AMP	Antimikrobielle Peptide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FISH	Fluoreszenz in situ-Hybridisierung
GALT	Gut-Associated Lymphoid Tissue (Darmassoziiertes lymphatisches Gewebe)
GIT	Gastrointestinaltrakt
IgE	Immunglobulin E
Leerwert	Analyse des Paraffins einer Probe, ohne die Probe selbst. Maß für Kontamination
Max	Maximum
Mean	Mittelwert
Min	Minimum
MMC	Migrating Motor Complex (Migrierender Motorischer Komplex)
N/A	Not Available (nicht verfügbar)
NEC	Nekrotisierende Enterocolitis
OP	Operation
OTU	Operational Taxonomic Unit (Aufgrund molekulargenetischer Daten unterschiedene biologische Einheiten)
PCoA	Principal Coordinates Analysis (Hauptkomponentenanalyse)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PPI	Protonenpumpeninhibitoren
QIIME	Quantitative Insights Into Microbial Ecology (Bioinformatik Plattform für Mikrobiom-Analysen)
RDP	Ribosomal Database Project (Ribosomendatenbank für Bakterien, Archaeen und Pilze)
RNA	Ribonukleinsäure
slgA	sekretorisches Immunglobulin A
16S rRNA	16S ribosomale RNA (Untereinheit des Ribosoms bei Prokaryoten)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung der Bakterienstämme über alle Proben und Gruppen	35
Abbildung 2: PCoA der Gruppe (1) zu Leerwert_Gruppe (1).....	37
Abbildung 3: PCoA Gruppe (2) zu Leerwert_Gruppe (2).....	38
Abbildung 4: PCoA Gruppen ohne Neutrophile.....	39
Abbildung 5: Verteilung der bakteriellen Stämme über die vier Gruppen	40
Abbildung 6: Bakterielle Verteilung in den Leerwerten der Gruppe (1) und (2)	43
Abbildung 7: Bakterielle Verteilung über alle Gruppen und Leerwerte	43
Abbildung 8: Boxplot der <i>Proteobakterien</i> über alle Gruppen	44
Abbildung 9: Boxplot der <i>Bacteroidetes</i> über alle Gruppen.....	45
Abbildung 10: Boxplot der <i>Firmicutes</i> über alle Gruppen	47
Abbildung 11: Boxplot der <i>Actinobakterien</i> über alle Gruppen	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick über die vier Gruppen	29
Tabelle 2: Übersicht über OP-Tag-Gruppen.....	32
Tabelle 3: ADONIS-Test mit Determinationskoeffizienten und p-Wert	36
Tabelle 4: Mittelwerte der hauptsächlich vorkommenden bakteriellen Stämme ...	41
Tabelle 5: Verteilung der <i>Proteobakterien</i> über alle Gruppen	45
Tabelle 6: Verteilung der <i>Bacteroidetes</i> über alle Gruppen.....	46
Tabelle 7: Verteilung der <i>Firmicutes</i> über alle Gruppen	47
Tabelle 8: Verteilung der <i>Actinobakterien</i> über alle Gruppen	48

1 Einleitung

1.1.1 Das Mikrobiom

1.1.2 Definition

Der menschliche Körper besteht aus 10^{13} eukaryotischen Zellen (Suerbaum, Hahn et al. 2012) und wird von ca. 10-mal so vielen Bakterien besiedelt, die zum größten Teil im Gastrointestinaltrakt zu finden sind (Savage 1977). Diese natürliche Mikroflora besteht aus mehr als 1.000 verschiedenen Bakterienarten, die sich vor allem auf der Haut, der Schleimhaut und dem Dickdarminhalt verteilen. Diese Mikroflora wird einerseits von der Immunabwehr unter Kontrolle bzw. Selektionsdruck gehalten und andererseits erschwert sie pathogenen Erregern den Zugang zum Wirt. Die Gesamtheit der bakteriellen Flora wird als Mikrobiom bezeichnet (Suerbaum, Hahn et al. 2012).

Der Begriff Mikrobiom wurde von Joshua Lederberg geprägt und beschrieben als „ökologische Gemeinschaft von symbiotischen und pathogenen Mikroorganismen, die buchstäblich unsere Körperoberfläche teilen (und als Determinanten von Gesundheit und Krankheit ignoriert worden sind)“ (Lederberg, McCray 2001). Als Mikrobiom wird auch die komplette Ansammlung an Genen eines Genoms von Mikroben bezeichnet, die in einer bestimmten Umgebung leben (Ley, Lozupone et al. 2008).

Bis vor wenigen Jahren konzentrierte sich die Forschung auf die Identifikation von krankheitsverursachenden Organismen und nur wenige Studien beschäftigten sich mit der natürlichen Mikroflora (NIH HMP Working Group, Peterson et al. 2009). Nach der Vollendung des Humangenetikprojekts wurden 2001 Stimmen laut, die darauf hinwiesen, dass trotz dieses wissenschaftlichen Meilensteins das Verständnis für die menschliche Biologie unvollständig bleiben würde, bis man die Interaktionen zwischen den menschlichen (oder tierischen) Zellen und dem Mikrobiom verstanden habe (Davies 2001).

Antoine van Leewenhoek verglich bereits um das Jahr 1680 orales und fäkales Mikrobiom und beobachtete auffällige Unterschiede zwischen diesen Milieus

beziehungsweise zwischen Proben von gesunden und kranken Individuen. Heutzutage stehen uns leistungsfähige, molekulare Techniken zur Verfügung um zu verstehen warum diese Unterschiede bestehen und wie die Medizin Einfluss nehmen kann (Ursell, Metcalf et al. 2012).

Obwohl die wirt-spezifischen Mikroben vermutlich aus der Umwelt erworben sind, unterscheidet sich die Zusammensetzung des Säugetier-Mikrobioms überraschend stark von frei-lebenden, nicht an tierische Organismen gebundenen mikrobiellen Gemeinschaften. Dies zeigt, dass die Co-Evolution zwischen Wirbeltieren und ihrer Mikroflora über Millionen von Jahren eine spezialisierte Gemeinschaft von Mikroben selektiert hat, die zum Beispiel in der warmen, nährstoffreichen und stabilen Umwelt des Darmes gedeihen (Ley, Lozupone et al. 2008).

Die Vielfalt des Mikrobioms ist viel größer als jene des menschlichen Genoms (Ursell, Metcalf et al. 2012). Allein für das Mikrobiom des Darmes wurde ein Genkatalog von 3,3 Millionen nicht-redundanter Gene beschrieben (Qin, Li et al. 2010). Im Vergleich dazu besteht das menschliche Genom aus zwischen 20.000 und 25.000 Protein kodierender Gene (International Human Genome Sequencing Consortium 2004). Auch die interindividuellen Unterschiede sind immens: Während das Genom zweier Individuen zu zirka 99.9% identisch ist (Wheeler, Srinivasan et al. 2008), zeigte das Mikrobiom der Hand (Fierer, Hamady et al. 2008) oder des Darmes (Turnbaugh, Hamady et al. 2009) Unterschiede von bis zu 80-90%. Daher wird das Heranziehen der Schwankungen des Mikrobioms in der personalisierten Medizin, in der die individuelle genetische Konstitution benutzt wird, um medizinische Entscheidungen zu fällen, nützlicher sein als Ansätze, die das relativ konstante menschliche Genom im Fokus haben (Ursell, Metcalf et al. 2012).

1.1.3 Tools für die Identifikation des Mikrobioms

Viele der im Mikrobiom enthaltenen Organismen können nicht kultiviert werden und sind daher nur mit molekularen Techniken nachweisbar. Da die Kosten für Sequenzierungen in den letzten Jahren drastisch reduziert werden konnten, ergab sich die Möglichkeit mikrobielle Stämme zu identifizieren, die bis dahin schwer

oder gar nicht mittels herkömmlichen Kulturen angelegt werden konnten (Ursell, Metcalf et al. 2012). Studien des Mikrobioms benötigen hochqualitative Daten, um signifikante Ergebnisse zu erhalten, was durch eine ausreichend große Anzahl von Proben von relevanten Entnahmeorten, der Berücksichtigung von etwaigen Störfaktoren und der Benützung adäquater Analyse-Techniken gewährleistet wird (Di Bella, Bao et al. 2013). Werden zum Beispiel Fäkalien als repräsentative Probe zur Bestimmung der gastrointestinalen Mikroflora herangezogen, erhält man nicht die gleichen Ergebnisse, als wenn mukosale Gewebeproben entnommen wurden (Eckburg, Bik et al. 2005). Neue Technologien im Bereich der Sequenzierung trugen dazu bei systematische Messabweichungen (Bias) zu reduzieren und ermöglichten die gleichzeitige Auswertung von hunderten Proben (Eloe-Fadrosh, Rasko 2013).

Nachfolgend werden drei der wichtigsten Sequenzierungstechniken beschrieben:

1.1.3.1 Amplicon-Sequenzierung

Der überwiegende Großteil der humanen Mikrobiom-Studien richtet seine Aufmerksamkeit auf die Charakterisierung der Zusammensetzung von mikrobiellen Gemeinschaften, also eine taxonomische Charakterisierung (Eloe-Fadrosh, Rasko 2013). Die Taxonomie umfasst die Lehren von der Klassifikation und der Nomenklatur, wobei Bakterien aufgrund phänotypischer Merkmale (morphologische, physiologische und chemische) in einem hierarchischen System geordnet werden (Kayser, Böttger et al. 2010). Bei Amplicon-Sequenzierungen wird ein bestimmtes Gen, Genfragment oder eine Sequenz amplifiziert und bestimmt. Sie wird normalerweise bei hochgradig konservierten, ribosomalen Untereinheiten von Bakterien durchgeführt, zum Beispiel bei Segmenten des 16S rRNA Gens, um zu bestimmen welche Organismen sich in einer Probe befinden und wie sie sich von der Umwelt unterscheiden (Di Bella, Bao et al. 2013, Eloe-Fadrosh, Rasko 2013).

1.1.3.2 Metagenom-Sequenzierung

Bei Metagenom-Sequenzierungen wird die gesamte DNA einer Probe sequenziert, um die enthaltenen Gene zu bestimmen und die Unterschiede in Bezug auf Funktionalität und Stoffwechselwege zwischen den verschiedenen Entnahmeorten der Proben zu erkennen (Di Bella, Bao et al. 2013). Obwohl die

Zusammensetzung der mikrobiellen Organismen zum Teil großen interindividuellen Unterschieden unterliegt, so teilen sie sich doch ein weites Spektrum an mikrobiellen Genen bestehend aus einem umfangreichen, identifizierbaren „Kern-Mikrobiom“ auf Gen- und damit funktioneller Ebene. Abweichungen von diesem „Kern“ resultieren in verschiedenen physiologischen Zuständen (Turnbaugh, Hamady et al. 2009).

1.1.3.3 Metatranscriptom-Sequenzierung

Bei Metatranscriptom-Sequenzierungen (RNA-Sequenzierungen) wird die gesamte RNA einer Probe sequenziert und deren Verteilung analysiert, um festzustellen welche Transkripte vorhanden sind und ob Gene unterschiedlich exprimiert werden (Di Bella, Bao et al. 2013), was auf unterschiedliche Aktivitätszustände der in der Probe enthaltenen Bakterien schließen lässt.

1.1.3.4 Zeitliche Unterschiede in der mikrobiellen Flora

Außerdem sei erwähnt, dass das Mikrobiom große zeitliche Unterschiede aufweisen kann und dass die Fluktuationen der mikrobiellen Zusammensetzung auf ein hochgradig individuelles, zeitliches Profil hindeuten können. So unterscheidet sich die vaginale mikrobielle Flora einer Frau je nach dem aktuellen Zeitpunkt des menstrualen Zyklus, der sexuellen Aktivität und anderen Umweltfaktoren (Eloe-Fadrosch, Rasko 2013).

1.2 Das Mikrobiom des Gastrointestinaltrakts

Wie bereits erwähnt, befinden sich auf und im menschlichen Körper zehnmal so viele mikrobielle wie tierische Zellen (NIH HMP Working Group, Peterson et al. 2009). Die meisten dieser Organismen finden sich im Gastrointestinaltrakt, wo sie Einfluss auf die menschliche Physiologie und die Aufnahme von Nahrungsstoffen haben, die ohne ihre Hilfe nicht verdaut werden könnten, vor allem durch die Spaltung von Polysacchariden (Hooper, Midtvedt et al. 2002). Die intestinale Mikroflora stellt daher ein wesentliches „Organ“ für die Ernährung, die Regulierung epithelialer Entwicklung und Entfaltung des angeborenen Immunsystems dar (Eckburg, Bik et al. 2005). Veränderungen des Mikrobioms durch Reduktion der bakteriellen Vielfalt, der Repräsentation bakterieller Gene und Änderung metabolischer Stoffwechselwege können zu einer Änderung physiologischer

Zuständen führen und Grund für beispielsweise Adipositas sein (Turnbaugh, Hamady et al. 2009).

1.2.1 Aufbau des Mikrobioms im GIT des Gesunden

Die gastrointestinale Umwelt ist keine homogene Umgebung, vielmehr spiegeln sich entlang der axialen (mukosal in Richtung Lumen) und longitudinalen (proximalen zu distalen) Gradienten im Gastrointestinaltrakt substantielle Unterschiede der mikrobiellen Gemeinschaftsstruktur wieder (Backhed, Fraser et al. 2012). Daher ist die Verteilung der verschiedenen Bakterienstämme im Gastrointestinaltrakt je nach Entnahmeort unterschiedlich.

1.2.1.1 Bakterielle Normalbesiedelung des Magens

Auf Grund der feindseligen Bedingungen im Magen galt dieser lange Zeit als erhebliche Barriere für oral aufgenommene Mikroorganismen und wurde grundsätzlich als steril angenommen (Yang, Nell et al. 2013). Obwohl sich schon viele Studien dem Mikrobiom in den restlichen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts gewidmet haben, weiß man aus verschiedenen Gründen noch relativ wenig über die Mikroflora des Magens, sei es aus der sich lange haltenden Annahme, die widrigen Bedingungen im Magen würden eine komplexe mikrobielle Flora nicht zulassen, den Schwierigkeiten in der Probenbeschaffung oder dem Mangel an effizienten molekularen Methoden, um nicht kultivierbare Mikroorganismen zu identifizieren (Wu, Yang et al. 2014). Mit der Entdeckung des gram-negativen *Epsilonproteobakteriums Helicobacter pylori*, einem kanzerogenen Krankheitserreger, der mehr als die Hälfte aller Menschen weltweit infiziert und eine chronische Inflammation der Magenmukosa induziert, die allerdings bei den meisten Infizierten keine Krankheitssymptome hervorruft, kam es zu einem Paradigmenwechsel (Yang, Nell et al. 2013). *Helicobacter pylori* lebt in den pH-neutralen Krypten der Magenschleimhaut und übersteht die Durchwanderung des sauren Magens, weil er mit seinem ammoniakproduzierenden Enzym Urease die Salzsäure kompensieren kann (Suerbaum, Hahn et al. 2012).

Einige körpereigene Verteidigungsmechanismen (niedriger pH, migrierender motorischer Komplex [MMC], Nitratzirkulation zwischen Darm und Speichel) sowie externe Faktoren (Ernährung, *Helicobacter pylori* Infektionen, Gabe von PPIs oder

Antibiotika, Magenerkrankungen) können signifikanten Einfluss auf die Zusammensetzung des Mikrobioms im Magen haben (Wu, Yang et al. 2014). Bei *Helicobacter pylori*-positiven Proben dominierte dieses Bakterium 93%-97% der erhaltenen Sequenzen und reduzierte die in den *Helicobacter pylori*-freien Proben gefundene bakterielle Vielfalt signifikant, was zeigt, wie gut sich dieses gram-negative Stäbchenbakterium an die saure Magen Umgebung angepasst hat (Andersson, Lindberg et al. 2008, Kayser, Böttger et al. 2010). Die nachfolgenden Studienergebnisse bezüglich der im Magen enthaltenen Mikroflora beziehen sich auf gesunde und *Helicobacter pylori*-freie Individuen.

Trotz geringer Probenzahl konnten mehrere Studien, die sich mit dem Thema beschäftigten, fünf dominierende bakterielle Stämme im Magen von *Helicobacter pylori*-freien Individuen bestimmen: *Firmicutes* (gram-positive Bakterien mit niedrigem Guanin-Cytosin-Gehalt), *Aktinobakterien* (gram-positive Bakterien mit hohem Guanin-Cytosin-Gehalt), *Bacteroidetes* (gram-negative Stäbchen), *Proteobakterien*, und *Fusobakterien* (Andersson, Lindberg et al. 2008, Bik, Eckburg et al. 2006, Suerbaum, Hahn et al. 2012, Li, Wong et al. 2009). In einer weiteren Studie wurden unter der Anwendung von neuen, Kontamination verhindernden Methoden 18 verschiedene bakterielle Taxa auf Gattung- oder Spezies-Ebene nachgewiesen, wobei *Lactobazillen*, *Veillonella sp.*, *Clostridien* (alle dem *Firmicutes*-Stamm angehörig) und *Corynebakterien* (*Aktinobakterien*-Stamm) vorherrschten. Vor allem die ersten drei sind gegenüber der sauren Magen Umgebung resistent und bilden laut dieser Studie eine residuale Mikroflora, die sich in die nachfolgenden Abschnitte des GIT entfalten kann (Zilberstein, Quintanilha et al. 2007).

Bei anderen durch Sequenzierungstechniken durchgeführten Studien fiel auf, dass jede der fünf oben genannten hauptsächlich vorkommenden bakteriellen Stämme (*Firmicutes*, *Aktinobakterien*, *Bacteroidetes*, *Proteobakterien*, *Fusobakterien*) von nur 1-2 tieferen taxonomischen Einheiten dominiert wurden. Zum Beispiel waren 254 von den 383 gefundenen Klonen des Stammes *Firmicutes* von der Gattung *Streptococcus* (66,32%). Die 5 am häufigsten gefundenen Gattungen waren *Streptococcus* (*Firmicutes*-Stamm), *Prevotella* und *Porphyromonas* (*Bacteroidetes*-Stamm), *Neisseria* und *Hämophilus* (*Proteobakterien*-Stamm), die

zusammen 70,5% aller bakteriellen Klone ausmachten, die beiden häufigsten Gattungen *Streptococcus* und *Prevotella* alleine 40,5% (Li, Wong et al. 2009, Bik, Eckburg et al. 2006).

Diese Resultate bestätigen die Annahme, dass die mikrobielle Flora in Abwesenheit von *Helicobacter pylori* vielfältiger ist als in Individuen mit *Helicobacter pylori*-Infektion (Bik, Eckburg et al. 2006, Andersson, Lindberg et al. 2008). Inwiefern diese Mikroflora allerdings eine ortsansässige, residente oder vorüberziehende, transiente bakterielle Population widerspiegelt ist weiterhin unklar. Die meisten der im Magen vorherrschenden Bakterien (z.B. *Streptococcus* oder *Prevotella*) wurden ebenfalls reichlich im Rachen gefunden, was zu der Annahme führt, dass die im Magen gefundenen Gattungen geschluckte Mikroorganismen der oberen Abschnitte des GIT repräsentieren. Allerdings wurden auch Stämme gefunden, die nur in *Helicobacter pylori*-freien Mägen, aber nicht im Rachen gefunden wurden; die mit Abstand am häufigsten vorkommenden waren *Proteobakterien* (Andersson, Lindberg et al. 2008).

1.2.1.2 Bakterielle Normalbesiedelung des Dünndarms

Das Mikrobiom des menschlichen Dünndarms ist auf Grund seiner schlechten Erreichbarkeit und schwierigen Probengewinnung noch relativ unerforscht (Zilberstein, Quintanilha et al. 2007). Durch das Fehlen von großen Datenmengen zu diesem Thema wird auch die Differenzierung von allochthonen Bakterien, die vorbeischwimmende, weitgehend irrelevante Stämme repräsentieren und autochthonen Mikroben, die eine stabile und funktionell relevante Gemeinschaft von ansässigen Bakterien repräsentieren, auch für die nachfolgenden Darmabschnitten erschwert (Dave, Higgins et al. 2012). Das Mikrobiom des Dünndarms ist charakterisiert durch seine im Vergleich zum Dickdarm geringen Dichte (10^2 - 10^7 Zellen/Gramm), die durch den raschen luminalen Durchfluss und der Sekretion von bakteriziden Substanzen zu Stande kommt. Für die adäquate Funktion des Dünndarms ist eine mukosale Intaktheit, zu der auch die mikrobielle Besiedelung zählt, von entscheidender Bedeutung. Mechanismen, die zu jener Intaktheit beitragen, sind unter anderem die Produktion von antimikrobiellen Peptiden (AMPs), die muzinöse Barriere, mukosale Antikörper, das

darmassoziierte Immunsystem (GALT: gut-associated-lymphoid-tissue) und die Peyer-Plaques (Aidy, van den Bogert et al. 2014).

Das jejunale und ileale Mikrobiom besteht aus Gemeinschaften von *Streptokokken*, *Lactobazillen*, *Gammaproteobakterien*, *Enterokokken* und *Bacteroides*. Die meisten Spezies sind fakultativ-anaerob oder aerob (Hayashi, Takahashi et al. 2005).

In einer anderen Studie zeigte sich eine relative Häufung von Bakterienarten, die der Ordnung der *Lactobacillales* und *Clostridiales* angehören, wobei es sich hauptsächlich um mit *Streptococcus bovis* verwandte Arten handelte und um Vertreter der *Veillonella* Gruppe. In geringerem Ausmaß fand man *Ruminococcus gnavus*, *Ruminococcus obeum* (Ordnung der *Clostridiales*) und *Bacteroides plebeius* (Ordnung der *Bacteroidales*). Zudem zeigten sich große interindividuelle und zeitliche Unterschiede: Über einen Zeitraum von neun Tagen änderte sich die mikrobielle Besiedelung eines Individuums in ihrer Zusammensetzung zu 56%. Fluktuationen innerhalb eines Tages konnten ebenfalls festgestellt werden und wurden auf die Ernährungsgewohnheiten der Individuen zurückgeführt (Booijink, El-Aidy et al. 2010, van den Bogert, Erkus et al. 2013). Trotz dieser Dynamik ist man davon überzeugt, dass es einen stabilen Kern von acht phylogenetisch verwandter Gruppen innerhalb des Mikrobioms gibt, zu denen Arten der Gattungen *Veillonella*, *Streptococcus*, *Clostridium cluster I* und *Enterococcus* gehören (Booijink, El-Aidy et al. 2010).

Obwohl viele unterschiedliche Bakteriengattungen in unterschiedlichen Proben festgestellt werden konnten (unter anderem *Enterococcus*, *Bacteroides* und *Lactobacillus*), wurden nur zwei Gattungen in allen Proben gefunden: *Streptococcus* und *Veillonella*, wobei letztere immer in geringerer Häufung auftraten. Die am relativ häufigsten entdeckten Arten der *Streptococcus* Gattung waren *S. salivarius*, *S. thermophilus* und *S. parasanguinis*, bei der *Veillonella* Population dominierten die Arten *V. dispar*, *V. parvula*, *V. rogosae* und *V. atypica* (van den Bogert, Erkus et al. 2013).

Die isolierten *Streptococcus*-Arten wiesen erhebliche Abweichungen in der Aufnahme und dem Metabolismus von Kohlenhydraten auf. Solche Charakteristika

spiegeln dabei die Adaptation der *Streptokokken* an der im Dünndarm von der individuellen Ernährung abhängigen Variabilität von Kohlenhydraten wider (Aidy, van den Bogert et al. 2014). Zwar waren alle *Streptococcus*-Arten in der Lage die Monosaccharide Galaktose, Glucose und Fructose, sowie die Disaccharide Maltose, Laktose und Saccharose zu verarbeiten, allerdings konnten nicht alle Arten zum Beispiel Arabinose, N-Acetylglucosamin, Trehalose oder Raffinose fermentieren, wodurch eine Unterscheidung in die verschiedenen Arten möglich gemacht wurde (van den Bogert, Erkus et al. 2013). Die *Veillonella*-Arten wiederum verarbeiten, als Nutzer von Milchsäure als Energiequelle, die bei der Fermentierung von Kohlenhydraten durch die *Streptokokken* anfallende Milchsäure und produzieren ihrerseits Essigsäure und Propionsäure (Aidy, van den Bogert et al. 2014).

Die Tatsache, dass dieselben *Streptococcus* und *Veillonella* Arten sowohl zu unterschiedlichen Zeitpunkten als auch bei unterschiedlichen Individuen gewonnen werden konnten, legt den Schluss nahe, dass diese Arten typische symbiotische Bakterien des Dünndarms sind (van den Bogert, Erkus et al. 2013).

1.2.1.3 Bakterielle Normalbesiedelung des Dickdarms

Der distale menschliche Darm repräsentiert einen anaeroben Bioreaktor, der mit einer enormen Menge an Bakterien gefüllt ist, welche von einer relativ geringen Anzahl von Stämmen dominiert werden, die ihrerseits allerdings eine hohe Vielfalt auf Höhe des Art- oder Gattungsniveaus besitzen. Diese Darmflora und ihr gesamtes Genom liefern uns die genetischen und metabolischen Eigenschaften, um zum Beispiel bestimmte Nährstoffe aufnehmen zu können, also Fähigkeiten, die wir bislang selbst nicht entwickeln mussten (Backhed, Ley et al. 2005).

Der distale Gastrointestinaltrakt ist das am dichtesten besiedelte mikrobielle Ökosystem mit zirka 10^{11} bis 10^{12} Mikroorganismen pro Gramm Stuhl (Dave, Higgins et al. 2012), und wird von den Bakterienstämmen *Firmicutes* und *Bacteroidetes* dominiert. Die Mehrheit der sequenzierten *Firmicutes* gehören der Klasse der *Clostridia* an, wobei vor allem die Gattungen *Ruminococcus*, *Clostridium*, und *Eubacterium* häufig gefunden wurden (Andersson, Lindberg et al. 2008, Eckburg, Bik et al. 2005, Arumugam, Raes et al. 2011). Bei den

Bacteroidetes gibt es große interindividuelle Variationsmöglichkeiten (Arumugam, Raes et al. 2011), wobei *Bacteroides thetaiotaomicron* immer gefunden wurde und für seine vorteilhafte Funktion für die Nährstoffabsorption und für die Reifung und Instandhaltung der epithelialen Zellen bekannt ist (Eckburg, Bik et al. 2005). *Proteobacteria* sind ebenfalls verbreitet, aber nicht dominant (Backhed, Ley et al. 2005). Das geringe Vorkommen von *Proteobacteria*-Sequenzen und damit auch von *Escherichia coli* ist nicht überraschend, da fakultativ anaerobe Arten zirka 0,1% der Bakterien in der streng anaeroben Umgebung des Colons ausmachen (Eckburg, Bik et al. 2005).

Nur in einer Studie waren neben *Firmicutes*, als am häufigsten vorkommender Bakterienstamm, *Actinobacteria* die am zweithäufigsten vorkommenden Bakterien und haben dabei die *Bacteroidetes* zahlenmäßig signifikant übertroffen. Die *Actinobacteria* wurden dabei von einigen wenigen Phylotypen dominiert, die zur Gattung *Bifidobacterium* und der Familie *Coriobacteriaceae* zählten. Wie sonst auch bestand der *Bacteroidetes*-Stamm hauptsächlich aus Vertretern der *Bacteroides*-Gattung (Andersson, Lindberg et al. 2008).

Zusätzlich wurden in verschiedenen Studien noch andere, weniger häufiger vorkommende Bakterienstämme im Dickdarm gefunden, sodass in Stuhlproben und Colonbiopsien insgesamt neun unterschiedliche Stämme ausgemacht werden konnten: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria*, *Spirochäten* und *VadinBE97* (Backhed, Ley et al. 2005, Eckburg, Bik et al. 2005, Dave, Higgins et al. 2012, Andersson, Lindberg et al. 2008). Im Gegensatz dazu finden sich in der gesamten Biosphäre viel mehr, nämlich über 70 verschiedenen Bakterienstämme. Dies zeigt, dass der menschliche Gastrointestinaltrakt auf eine kleine Anzahl von Stämmen beschränkt ist, die allerdings einen großen Reichtum an unterschiedlichen Arten und unterschiedlichen Häufungen besitzen (Dave, Higgins et al. 2012).

Die bakterielle Vielfalt innerhalb des Darms und zwischen Darm und Faeces ist größer als lange Zeit angenommen. Auch die interindividuellen Unterschiede sind markant und weitreichender als die intraindividuellen, mit Ausnahme der Differenzen zwischen an Mukosa gebundenen Bakterienstämmen und jene im

Stuhl (Eckburg, Bik et al. 2005). Das Mikrobiom des Caecums unterscheidet sich in vielen Punkten stark von jenem im Rektum und Sigma. Obwohl auch im Caecum die im Rektum und in Faeces vorherrschende Gruppe der *Bacteroides*, *Clostridium leptum* und *Clostridium coccooides* gefunden wurden, war ihre Häufung hier geringer. Die zökale Mikroflora wurde von *Lactobacillus*, *Enterococcus* und *Escherichia coli* dominiert. In geringerer Quantität wurden auch *Enterobacter asburiae*, *Streptococcus salivarius* und *Streptococcus pneumoniae* sequenziert. Auch im Caecum waren fakultative anaerobe Bakterien die vorherrschenden Arten, allerdings waren auch obligate aerobe Vertreter der *Bacteroides*, *Clostridium coccooides* und *Clostridium leptum* Gruppen vorhanden. Die obligat anaeroben Vertreter der gleichen Gruppen waren hingegen die dominierenden Arten der recto-sigmoidalen Mikroflora (Hayashi, Takahashi et al. 2005).

Die Mikroben im menschlichen Darm sind einem Selektionsdruck seitens des Wirts und der mikrobiellen Konkurrenz ausgeliefert, wodurch es zu Bakterienstämmen mit einer hohen und einer niedrigeren Dichte kommt. Durch metagenomische Untersuchungen können Eigenschaften erkannt werden, die es den in geringer Menge vorkommenden Bakterien ermöglichen zu überleben. Zum Beispiel produziert das nur im geringen Ausmaß vorhandene Bakterium *Escherichia coli* über 90% von zwei für die Anordnung der bakteriellen Pili verantwortlichen Proteine, FimA (COG3539) und PapC (COG3188) (Arumugam, Raes et al. 2011). Diese Pili ermöglichen es den Mikroben gewisse Epithelien des Wirts zu besiedeln. Sie helfen den Mikroben länger im Gastrointestinaltrakt zu verbleiben, indem sie sich an Schleim oder Mannose-Ketten auf den intestinalen Oberflächenstrukturen binden. Außerdem sind sie Schlüsselemente im Transfer von Plasmiden zwischen Bakterien durch Konjugation, wodurch Schutzmechanismen und Resistenzen gegen zum Beispiel Antibiotika ausgetauscht werden (Krogfelt 1991). Dies zeigt, dass auch Spezies, die nur im geringem Maß im Darm vorkommen, einen wesentlichen Beitrag zur Homöostase leisten und nicht außer Acht gelassen werden dürfen (Arumugam, Raes et al. 2011).

Des Weiterem wurde entdeckt, dass 40% der bakteriellen Gene von jedem untersuchten Individuum geteilt wurden. Diese Gene sind in der Degradierung und Verdauung von komplexen Zuckern, der Produktion von kurzkettigen Fettsäuren und der Biosynthese von Vitaminen beteiligt. Obwohl große interindividuelle Unterschiede im Aufbau des Mikrobioms des Gastrointestinaltrakts bestehen, scheint es also ein gewisses Kern-Mikrobiom auf funktioneller Ebene zu geben (Dave, Higgins et al. 2012).

In der größten Studie, die bisher zum Thema Mikrobiom des Darms durchgeführt wurde, konnte mittels multidimensionaler Cluster-Analyse und Principal Component Analysis (PCoA) gezeigt werden, dass die dortigen Proben drei deutliche Cluster bildeten, die man als Enterotypen bezeichnet. Jeder dieser Enterotypen ist am Ausmaß von einem der drei folgenden Gattungen erkennbar: *Bacteroides* (Enterotyp 1), *Prevotella* (Enterotyp 2) und *Ruminococcus* (Enterotyp 3). Die dominanten Bakterien von Enterotyp 1 leiten sich Energie von Kohlenhydraten und Proteinen ab, während Enterotyp 2 Muzin-Glykoproteine der mukosalen Schichtung im Darm zersetzen und der *Ruminococcus* dominierte Enterotyp 3 Muzin und Saccharide spaltet (Arumugam, Raes et al. 2011). Wie schon erwähnt spielen Bakterien nicht nur bei der Spaltung von komplexen Zuckern eine Rolle, sondern sind auch bei der Biosynthese von Vitaminen involviert (Dave, Higgins et al. 2012). Obwohl alle Enterotypen im Vitamin-Stoffwechsel repräsentiert wurden, waren die Enterotypen 1 und 2 besonders an der Biosynthese verschiedener Vitamine beteiligt, wobei Enterotyp 1 bei Biotin, Riboflavin, Pantothenat und Ascorbinsäure und Enterotyp 2 bei Thiamin und Folat am meisten Wirkung zeigte (Arumugam, Raes et al. 2011).

Diese Enterotypen sind das Ergebnis von ausgeglichenen, festgelegten mikrobiellen Zusammensetzungen, von denen es über alle Individuen verteilt nur eine begrenzte Anzahl gibt. Sie sind dabei nicht so scharf abgegrenzt wie zum Beispiel menschliche Blutgruppen, könnten aber genauso gut Individuen charakterisieren, was nahelegt, dass das Darm-Mikrobiom innerhalb eines Individuums eher stabil ist und sich nach Störungen wieder herstellen kann (Arumugam, Raes et al. 2011).

1.3 Die Appendix

1.3.1 Anatomie der Appendix

Die Appendix vermiformis, zu Deutsch „Wurmfortsatz“, ist in Größe und Form äußerst variabel und geht dorsomedial vom Caecum ab. Sie mündet mit dem kleinen Ostium appendicis vermiformis in das Caecum. Die Länge der Appendix schwankt zwischen 2 bis 20 Zentimetern, die Dicke beträgt durchschnittlich sechs Millimetern. Das Lumen des Wurmfortsatzes ist mit zwei Millimetern äußerst eng, teilweise sogar völlig verschlossen, enthält Schleim und etwas Darminhalt. Die Schleimhaut besitzt eine besonders große Zahl an Folliculi lymphatici aggregati. Beim Neugeborenen geht die Appendix vermiformis noch trichterförmig in das Caecum über, beim Erwachsenen ist sie meist scharf abgegrenzt (Anderhuber, Bechmann et al. 2012).

1.3.2 Funktion der Appendix

1.3.2.1 Vergleichende Anatomie der Appendix

Die physiologische Funktion der Appendix war und ist nach wie vor umstritten, wobei dieses Organ oft als Überrest der evolutionären Entwicklung ohne Funktion angesehen wurde (Barlow, Muhleman et al. 2013, Laurin, Everett et al. 2011, Randal Bollinger, Barbas et al. 2007). Solche evolutionären Überbleibsel sind reduzierte Strukturen, die bei Vorfahren eine wichtigere physiologische Rolle spielten als bei ihren heutigen Nachfahren. Andererseits kann ein solches Überbleibsel aber auch als Struktur definiert werden, die im Vergleich zu homologen Strukturen in anderen Organismen eine reduzierte und rudimentäre Funktion zeigt. Viele sehen in der Appendix vermiformis einen Abkömmling und evolutionären Rest eines viel größeren Caecums eines Herbivoren. Die Größe des Caecums ist direkt proportional zur Pflanzenmenge in der Ernährung des Tieres, da sich im Caecum spezialisierte Bakterien finden, die durch die Sekretion des Enzyms *Cellulase* die in den Pflanzen enthaltene Cellulose aufspalten können, wodurch sie verdaulich wird. Die menschliche Appendix und das Ende des Caecums von Säugetieren wurden als strukturell homologe Strukturen angesehen, wodurch die Stellung der Appendix vermiformis als evolutionäres Überbleibsel begründet wurde (Ansaloni, Catena et al. 2009). Vergleichende anatomische Studien bei Primaten hatten aber schon in der Vergangenheit gezeigt, dass es

eine progressive Zunahme an struktureller Komplexität zwischen den verschiedenen Vertretern der Primaten gibt, angefangen bei den Halbaffen über die primitiven, kleineren Affen, gefolgt von größeren Affenarten und schließlich in den anthropoiden, menschenähnlichen Affen und beim Menschen selbst gipfelnd. Da sich die Struktur der Appendix vermiformis also fortschreitend entwickelt hat, sollte es nicht als degeneratives Überbleibsel, sondern als zu einem gewissen Zweck entwickeltes Organ angesehen werden (Scott 1980). Obwohl die Appendix offensichtlich in manchen Spezies verloren gegangen ist, ist sie dennoch über 80 Millionen Jahre aufrechterhalten worden, was die Idee, die Struktur könnte eine bedeutende biologische Funktion haben, unterstreicht (Smith, Fisher et al. 2009).

1.3.2.2 Immunologische Funktion und Biofilmproduktion der Appendix

Zudem beweisen neuere Erkenntnisse eine mögliche immunologische Funktion der Appendix (Randal Bollinger, Barbas et al. 2007). In einer elektronenmikroskopischen Studie wurde gezeigt, dass die menschliche Appendix alle Charakteristika eines gut entwickelten lymphoiden Organs beinhaltet und sich daraus wichtige immunologische Funktionen herleiten könnten (Gorgollon 1978). Die erhebliche Menge an lymphatisches Gewebe in der Appendix, genannt GALT (gut-associated lymphoid tissue), soll das Wachstum verschiedenster nützlicher bakterieller Kolonien im Dickdarm erlauben und die dünne, längliche Form des Organs könnte den Verlust selbiger Bakterien im Rahmen einer Durchfallerkrankung verhindern (Barlow, Muhleman et al. 2013, Randal Bollinger, Barbas et al. 2007). Voraussetzung hierfür ist das Vorhandensein eines widerstandsfähigen Biofilms. Unter einem Biofilm versteht man eine strukturierte Gemeinschaft von Bakterienzellen, eingebettet in einer selbstproduzierten Polymatrix, die auf einer inerten Oberfläche oder auf lebendem Gewebe haftet. Die in der Tiefe dieser Beläge befindlichen Bakterien sind weitgehend vor dem Immunsystem, Antibiotika aber auch anderen pathogenen Bakterien und Viren geschützt (Kayser, Böttger et al. 2010, Randal Bollinger, Barbas et al. 2007). Es konnte gezeigt werden, dass sIgA (sekretorisches IgA), das sonst dafür bekannt ist Bakterien im Darm zu agglutinieren, die Beseitigung selbiger aus dem Gastrointestinaltrakt zu fördern und deren Translokation, die zu Sepsis und Tod führen könnte, mittels des Prozesses des „Immunausschluss“ zu verhindern, tatsächlich auch die Entstehung von Biofilm Formationen erleichtern. Ein ebenso

am „Immunausschluss“ beteiligtes Glykoprotein namens Muzin ist auch für die Entstehung von Biofilmen verantwortlich. Gestützt werden diese Thesen durch die Erkenntnisse, dass im Darm vermehrt Bakterien mit sIgA Rezeptoren als solche ohne gefunden wurden, woraus man schließen kann, dass im Darm ein Selektionsdruck in Richtung Bakterien mit sIgA Rezeptoren herrscht. sIgA haben die Möglichkeit sich gleichzeitig an Bakterien mit Rezeptoren, aber auch an Bakterien ohne Rezeptoren und an Epithelzellen zu binden, wodurch sie die Entstehung von Biofilmen fördern. Dies ist im Falle des Darms auch wichtig, da sich hier im Gegensatz zum Blut, eine symbiotische Flora ansiedeln muss und dadurch nützliche Vorteile für den Wirt entstehen (Bollinger, Everett et al. 2003). Die Mikroorganismen bekommen vom Wirt Nahrung und einen Lebensraum, der Wirt ist von den Fähigkeiten der symbiotischen Bakterien abhängig, indem sie infektiöse Organismen abwehren, die normale Entwicklung des Immunsystems vorantreiben und ihn bei der Verdauung unterstützen (Laurin, Everett et al. 2011). Biofilme zeigten sich innerhalb des Dickdarms in der Appendix als am prominentesten, sowohl was bakterielle Dichte als auch Biofilm-Kontinuität entlang der epithelialen Oberfläche angeht. Die Dicke und Dichte der Biofilme nahmen kontinuierlich vom oralen zum analen Ende des Dickdarms ab (Palestrant, Holzkecht et al. 2004, Randal Bollinger, Barbas et al. 2007). In Zusammenschau der oben genannten Erkenntnisse mit der anatomischen Architektur des Dickdarms kam man zum Schluss, dass die Appendix ein für die Erhaltung nützlicher, symbiotischer Mikroorganismen gut-geeigneter Raum ist, der auf Grund seiner Lokalisation am terminalen Ende des Caecum und seines engen Lumens Kontaminationen durch pathogene Organismen, die im fäkalen Strom vorhanden sind, entgehen kann. Durch die besonders in der Appendix vorhandenen und durch dessen Struktur und lymphatischen Gewebe begünstigten Biofilme werden symbiotische, nicht pathogene Bakterien effektiv konserviert und geschützt, wodurch man dieses Organ als „safe-house“ bezeichnen könnte. Das regelmäßige Abschilfern und Regenerieren der Biofilme in der Appendix ermöglicht eine Wiederbesiedelung des Dickdarms mit symbiotischen Bakterien im Falle einer Infektion durch ein Pathogen, welches in Folge als defensive Reaktion zusammen mit den restlichen vorhandenen Bakterien mittels Diarrhoe ausgeschwemmt wurde (Randal Bollinger, Barbas et al. 2007, Laurin, Everett et al. 2011).

1.3.2.3 Funktion der Appendix in der postindustriellen Ära

Wenn nun aber die Appendix diese wichtige Aufgabe zu erfüllen hat, wieso kommt es dann in Folge der zum Beispiel im Rahmen einer Appendizitis häufig durchgeführten Appendektomie und dem damit einhergehenden Funktionsverlust des Organs nicht zu mehr postoperativen Komplikationen? Diarrhoe durch virale Gastroenteritiden und Mangelernährung sind vorherrschende Probleme in den Entwicklungsländern (Barlow, Muhleman et al. 2013). Ein Fünftel aller Todesfälle bei Kindern, das entspricht 1,5 Millionen Kinder pro Jahr, haben als Ursache Diarrhoe, was es neben den Pneumonien zur zweithäufigsten Todesursache bei Kindern unter 5 Jahren macht (Wardlaw, Salama et al. 2010). Die Wiederherstellung einer nützlichen Darmflora scheint also besonders in jenen Gegenden nützlich zu sein, in denen Diarrhoen, Mangelernährung und Mangel an sauberem Trinkwasser verbreitet sind und somit lebensbedrohliche Zustände darstellen, besonders bei den Jungen (Smith, Fisher et al. 2009). In Industrieländern mit moderner medizinischer Versorgung mit (unter anderem) Antibiotika und Hygienemaßnahmen hingegen scheint eine solche Funktion unnötig zu sein, da Ausbrüche von enterischen Pathogenen, die die funktionelle Flora eliminieren würden, nicht große Teile der Bevölkerung gleichzeitig betreffen, was eine Wiederbesiedelung mit nützlichen Darmbakterien nicht unbedingt notwendig erscheinen lässt und daher keine Komplikationen nach Appendektomie zu erwarten sind (Randal Bollinger, Barbas et al. 2007, Smith, Fisher et al. 2009, Sanders, Bollinger et al. 2013). Da der Appendix in der postindustriellen Zeit die nötige Stimulation fehlt, ist sie überreaktiv und sensitiv, wie auch andere Komponenten des Immunsystems, die in präindustriellen Bevölkerungen eine wichtige Rolle in der Infektabwehr spielen, wie zum Beispiel die Produktion hoher IgE-Spiegel zur Abwehr von Parasiten, die in Industrieländern bei Fehlen von Parasiteninfektionen zu Nebenwirkungen in Form von Allergien führen. Genauso könnte auch die vormals wichtige Funktion der Appendix als für die postindustrielle Ära schlecht angepasst gesehen werden (Laurin, Everett et al. 2011) und die Dichte an lymphatischen Gewebe mit möglicher Proliferation nicht nur für die lebensbedrohliche Appendizitis sondern auch für chronisch entzündliche Darmerkrankungen verantwortlich sein (Ansaloni, Catena et al. 2009).

1.3.2.4 Beispiel für die Funktion der Appendix – *Clostridium difficile* Colitis

Obwohl sich das Mikrobiom des Gastrointestinaltrakts in den Industriestaaten also nicht mehr mit den Gefahren der Entwicklungsländer konfrontiert sieht, stellt sich mittlerweile eine neue Bedrohung in Form des verbreiteten Verabreichens von Breitspektrum-Antibiotika dar. Dies führt zu einem übermäßigen Wachstum von *Clostridium difficile*, einem gram-positiven, sporenbildenden, anaeroben Bazillus, und zur Entwicklung einer *Clostridium difficile* Colitis, was bei wiederholtem Auftreten zu massiven bis lebensbedrohlichen medizinischen Problemen führen kann (Sanders, Bollinger et al. 2013, Seretis, Seretis et al. 2014). Zunächst würde man erwarten, dass das Vorhandensein einer Appendix protektiv gegenüber einer Überbesiedelung mit *Clostridium difficile* wirken würde (Seretis, Seretis et al. 2014), es bleibt aber bisher unklar, ob die Appendix die symbiotischen Bakterien gegenüber den der Infektion vorausgehenden Antibiotika beschützen kann. Aktuelle Daten zeigen, dass das Vorhandensein oder die Abwesenheit der Appendix kaum Einfluss auf das initiale Auftreten einer *Clostridium difficile* Colitis hat (Sanders, Bollinger et al. 2013). Allerdings zeigen andere Studien, dass eine funktionierende Appendix eine protektive Rolle vor rezidivierenden *Clostridium difficile* Colitiden übernimmt (Im, Modayil et al. 2011). Ob das vermehrte Auftreten von *Clostridium difficile* Colitiden mit der fehlenden Besiedelung der in der Appendix sicher verwahrten Bakterien oder mit der durch den Verlust eines lymphatischen Organs einhergehenden Immunsuppression zusammenhängt ist nicht ganz klar (Sanders, Bollinger et al. 2013). Allerdings zeigt die Fähigkeit der Appendix protektiv gegenüber rezidivierende *Clostridium difficile* Colitiden wirken zu können, dass sie auch in postindustriellen Gebieten eine nützlichere Rolle innehat, als zuvor angenommen (Barlow, Muhleman et al. 2013). Um die ursprüngliche Funktion der Appendix und ihre jetzige Bedeutung genauer verstehen zu können, wird aber noch mehr Forschung auf diesem Gebiet nötig sein.

1.3.3 Das Mikrobiom der Appendix

Es gibt derzeit noch wenig Information über die physiologische Zusammensetzung des Mikrobioms der Appendix. Die Daten die derzeit zur Verfügung stehen stützen sich größtenteils auf die Untersuchung von Organen nach Appendektomie bei

(Verdacht auf) Appendizitis und sind somit auf Grund der Entzündung möglicherweise nicht aussagekräftig was die Besiedelung im Gesunden angeht. Das Mikrobiom des Appendix zeigt eine große Vielfalt verschiedenster Bakterienstämme. Insgesamt konnten 15 verschiedene Stämme identifiziert werden, wobei allerdings die 5 Stämme *Firmicutes*, *Proteobakterien*, *Bacteroidetes*, *Fusobakterien*, und *Aktinobakterien* dominierten, aber auch andere Stämme wie *Spirochäten*, *Deferribacteres*, *Verrumicrobia*, *Deinococcus-Thermus* und *Chloroflexi*, allerdings nur in manchen Proben bei niedrigen Spiegeln von 1 bis 2 Prozent gefunden wurden. Der am häufigsten gefundene Stamm war *Firmicutes* gefolgt von *Proteobakterien* (Guinane, Tadrous et al. 2013, Zhong, Brower-Sinning et al. 2014). Im Bereich der Subpopulationen herrschte ebenfalls große Vielfalt. Von den 12 Familien, die im Stamm der *Firmicutes* gefunden wurden, waren *Lachnospiraceae* (46%), *Ruminococcaceae*, *Lactobacillaceae* und *Streptococcaceae* die am häufigsten vorkommenden, bei den *Proteobakterien* dominierte die Familie der *Enterobacteriaceae*. Bei den anderen Stämmen dominierte eine beziehungsweise wurde nur eine Familie identifiziert: *Bacteroidaceae* bei den *Bacteroidetes*, *Fusobacteriaceae* bei den *Fusobakterien* und *Bifidobacteriaceae* bei den *Aktinobakterien*. Trotz der enormen Vielfalt der repräsentierten Bakterien machte dennoch eine kleine Anzahl an Spezies die Mehrheit der Bakterien aus, besonders Mitglieder der Familien der *Enterobacteriaceae* und *Lachnospiraceae* und die Arten *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* und *Bifidobacterium*. Im Anbetracht dieser Ergebnisse zeigt sich die bakterielle Besiedelung der Appendix als vielfältiger als die im restlichen Gastrointestinaltrakt oder in Stuhlproben. Dies bezieht sich allerdings nur auf die Diversität, die Dichte an Bakterien nimmt vom Ileum bis zum Colon sigmoideum kontinuierlich zu, deshalb ist auch die Dichte der Bakterien in Stuhlproben größer als jene in der Appendix (Guinane, Tadrous et al. 2013). Die Spiegel an *Fusobakterien* in der Appendix variierten am stärksten, wobei die höchste Konzentration in einer infizierten Appendix gefunden wurde (Guinane, Tadrous et al. 2013). Diese Beobachtung korreliert mit den Forschungsergebnissen anderer Studien, die das Auftreten einer akuten Appendizitis mit einer vorangehenden lokalen Invasion mit *Fusobakterien* in Zusammenhang bringen (Zhong, Brower-Sinning et al. 2014, Swidsinski, Dorffel et al. 2011). Lange Zeit galt eine Obstruktion der Appendix als auslösende Ursache

einer Appendizitis. Im Zuge einer FISH-Analyse konnten in 62% resezierter Appendices im Zuge einer akuten Appendizitis invasive *Fusobakterien* gefunden werden, vor allem die Arten *Fusobacterium nucleatum* und *Fusobacterium necrophorum*, die in die epitheliale Oberfläche eindringen, sich im Subepithelium ausbreiteten und deren Konzentration mit dem Ausmaß der Entzündung positiv korrelierten (Swidsinski, Dorffel et al. 2011). Die Konzentration der anderen Bakterienstämme verhielt sich im Gegensatz dazu indirekt proportional zum Schweregrad der Entzündung. Solche invasiv eindringenden *Fusobakterien* wurden nur in entzündeten Appendices gefunden, fehlten aber völlig in den Kontrollproben (Swidsinski, Dorffel et al. 2011, Zhong, Brower-Sinning et al. 2014). Außerdem enthielten die entzündeten Proben vermehrt Bakteriengattungen die normalerweise oral angesiedelt sind, zum Beispiel *Porphyromonas* (Gram-negatives anaerobes Bakterium des *Bacteroidetes*-Stamm), *Parvimonas* (Obligat anaerobes Bakterium des *Firmicutes*-Stamm, das vorwiegend bei Kindern mit Periodontitis gefunden wird) und *Gemella* (Gram-positives fakultativ anaerobes Bakterium des *Firmicutes*-Stamm) (Zhong, Brower-Sinning et al. 2014). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass eine akute Appendizitis mit einem vermehrten Auftreten von *Fusobakterien* und anderen Pathogenen einhergeht, die normalerweise in der Mundhöhle zu finden sind. Ob diese Mikroorganismen der Auslöser für die Entzündung sind oder im Zuge dieser proliferieren ist noch nicht geklärt (Barlow, Muhleman et al. 2013, Swidsinski, Dorffel et al. 2011).

Die Appendix scheint also eine große Vielfalt von Darm-Mikroben zu beherbergen, inklusive signifikanter Mengen an nützlichen Bakterien, die Indikatoren für einen gesunden Gastrointestinaltrakt sind (Guinane, Tadrous et al. 2013). Die Rolle der Appendix als Ausgangspunkt der Neubesiedelung des Darms mit nützlichen Bakterien nach Elimination der sonst dort ansässigen Mikroben durch zum Beispiel eine Durchfallerkrankung scheint damit noch wahrscheinlicher (Laurin, Everett et al. 2011, Randal Bollinger, Barbas et al. 2007, Barlow, Muhleman et al. 2013). Es werden aber noch weitere Studien über das Mikrobiom der Appendix nötig sein, um dessen Funktion und Rolle in Bezug auf die Gesundheit des Gastrointestinaltrakts festzustellen beziehungsweise um die Bedeutung der in der Appendix vorhandenen Bakterien bei einer Appendizitis zu verstehen und mögliche andere Therapien als die bisher obligate Appendektomie zu finden. Eine

wichtige Voraussetzung hierfür ist zu verstehen, wie die Entwicklung des Mikrobioms im Darm und insbesondere jene in der Appendix abläuft. Hierzu untersuchten wir die bakterielle Besiedelung entzündungsfreier Appendices von Neugeborenen, Säuglingen und Kleinkindern, um deren Zusammensetzung festzustellen und einen Ausgangspunkt für weitere Studien bezüglich der Entwicklung des Mikrobioms zu schaffen.

2 Material und Methoden

2.1 Probenmaterial

Ziel der hier durchgeführten Studie war die Erfassung des physiologischen Mikrobioms der Appendix bei Neugeborenen. Hierzu wurde eine Anfrage für 70 entzündungsfreie Appendices an die Biobank der Medizinischen Universität Graz versendet. Alle Appendices wurden vor dem Jahr 2007 von Säuglingen und Kindern bis zum 10. Lebensjahr entnommen. Das jüngste Kind war bei Entnahme ein Frühgeborenes in der 23. Schwangerschaftswoche, das älteste bei Entnahme 10 Jahre alt. Von der Biobank der Medizinischen Universität Graz erhielt man schlussendlich 56 verwertbare Proben. Informationen über die den Proben zugehörigen Patienten und Patientinnen wurden retrospektiv aus dem krankenhauses internen Informations- und Kommunikationssystem Medocs entnommen. Die Proben wurden daraufhin in 4 Gruppen gegliedert. Tabelle 1 gibt einen Überblick.

	Definition: Appendices..	Anzahl	OP-Gewicht	OP-Alter	Nahrung vor OP
Gruppe (1)	..ohne Nahrungsaufnahme	11	1660g-3890g	1d	nein
Gruppe (2)	..von Frühgeborenen <1500g	12	560g-1500g	0d-86d	8 ja, 2 nein, 2 N/A
Gruppe (3)	..von Früh-/Neugeborenen	17	1500g-3900g	8d-163d	16 ja, 1 nein
Gruppe (4)	..von 5-10 Jährigen	16	N/A	5a-10a	ja

Tabelle 1: Überblick über die vier Gruppen

Gruppe (1) bestand aus 11 Proben (19,64% der Gesamtproben) von Appendices bei Früh- (35. SSW) beziehungsweise Neugeborenen (40. SSW), die noch am Tag der Geburt operiert worden sind, zu einem Zeitpunkt, an dem noch keine orale Ernährung oder antibiotische Therapie stattgefunden hatte. Ihr Geburts- und damit auch Operationsgewicht betrug zwischen 1600 und 3890 Gramm. In 9 dieser Fälle

(81,82%) war der Grund für die Operation eine Gastroschisis, in 2 Fällen (18,18%) eine Omphalozele. 6 dieser Kinder (54,55%) kamen per Sectio zur Welt, 5(45,45%) spontan. 7 Proben (63,64%) kamen von weiblichen, 4(36,36%) von männlichen Neugeborenen.

Gruppe (2) bestand aus 12 Proben (21,43% der Gesamtproben) von Frühgeborenen zwischen der 23. und der 33. (38.) Schwangerschaftswoche, die zum Zeitpunkt der Entnahme ein Operationsgewicht von unter 1500 Gramm besaßen. Dabei handelte es sich um 4 weibliche (33,33%) und 8 männliche (66,67%) Frühgeborene. Gründe für die Operationen und die gleichzeitige Entnahme der Appendices waren in 3 Fällen (25%) ein Volvulus beziehungsweise Malrotation, in 3 Fällen (25%) ein Ileus, in 2 Fällen (16,67%) eine nekrotisierende Enterocolitis (NEC), in 2 Fällen (16,67%) eine Duodenalatresie, in einem Fall (8,33%) ein Ileostomie-Prolaps und einmal (8,33%) ein Subileus beziehungsweise Volvulus. 7 der 12 Frühgeborenen (58,33%) kamen spontan zur Welt, 3 (25%) per Sectio, in den beiden anderen Fällen (16,67%) konnte die Entbindungsart retrospektiv nicht ermittelt werden. In 8 Fällen (66,67%) kam es präoperativ zur oralen Nahrungsaufnahme, in 2 Fällen nicht (16,67%), in den beiden anderen Fällen (16,67%) konnte diese Information retrospektiv nicht erhoben werden. Bei 9 Patienten (75%) erfolgte präoperativ außerdem eine Antibiotikagabe, in einem Fall nicht (8,33%), in den beiden restlichen Fällen (16,67%) konnte die Information retrospektiv nicht erhoben werden.

Gruppe (3) bestand aus 17 Proben (30,36% der Gesamtproben) von Neugeborenen und Säuglingen, die 8 bis 163 Tage nach ihrer Geburt operiert wurden. Ihr Operationsgewicht betrug zwischen 1500 und 4000 Gramm. Bei 10 der Kinder (58,82%) handelte es sich um männliche, bei 6 (35,29%) um weibliche Neugeborene oder Säuglinge. Bei einem Neugeborenen (5,88%) wurde das Geschlecht zunächst als intersexuell angegeben, später wurde sie genetisch als weiblich bestimmt. Die Entbindungsart war in 12 Fällen (70,59%) eine Sectio, in 4 Fällen (23,53%) erfolgte die Geburt spontan, einmal (5,88%) musste eine Vakuumextraktion erfolgen. In 16 Fällen (94,12%) erfolgte präoperativ eine orale Nahrungsaufnahme, nur in einem Fall (5,88%) wurde das Kind bis zur Operation vollparenteral ernährt. In allen Fällen kam es präoperativ zur Antibiotikagabe. Die

Gründe für eine Operation mit gleichzeitiger Appendektomie waren zahlreich, mit 6 Fällen (35,29%) am häufigsten auf Grund eines Ileus (einmal bei Zustand nach Gastroschisis). In zwei Fällen (11,76%) lag eine Ileumperforation (einmal nach nekrotisierender Enterocolitis) vor. Andere Operationsgründe die jeweils in einem Fall (5,88%) vorlagen umfassten einen Volvulus, eine Zwerchfellhernie, ein Pancreas anulare mit Malrotation, eine nekrotisierende Enterocolitis (NEC), eine Malrotation, ein Stomaprolaps nach Subileus, einmal ein multiples Missbildungssyndrom, einmal Motilitätsstörung post Dünndarmatresie und einmal eine Zwerchfellraffung bei gleichzeitig bestehender Leistenhernie.

Gruppe (4), die als Kontrollgruppe fungierte, bestand aus 16 Proben (28,57% der Gesamtproben) von Kindern im Alter zwischen 5 und 10 Jahren. 10 dieser Kinder (62,5%) waren weiblich, 6 (37,5%) waren männlich. Die Indikationen zur Operation waren in jeweils 6 Fällen (je 37,5%) eine Appendizitis acuta oder subacuta, in zwei Fällen (12,5%) bestand der Verdacht einer Appendizitis katarrhalis, in einem Fall (6,25%) wurde auf Grund eines chronisch rezidivierenden Unterbauchschmerz rechts operiert. Bei einer Probe (6,25%) konnte der Grund für die Operation retrospektiv nicht ermittelt werden. In den anschließenden histologischen Befunden wurde fünfmal (31,25%) die Diagnose einer Appendicopathia oxyurica gestellt, zweimal (12,5%) ergab der Befund einen Kotstau der Appendix, in den restlichen Fällen (56,25%) fehlte der histologische Befund.

In weiterer Folge wurden die Proben auch noch zusätzlich in vier Gruppen dem OP-Tag entsprechend unterteilt, da sich Gruppen (2) und (3) vorwiegend im OP-Gewicht unterschieden, es aber in beiden Gruppen Proben gab, die zeitnah nach der Geburt beziehungsweise erst mehrere Wochen danach entnommen wurden. Daher traf man zum besseren Verständnis der Entwicklung des Mikrobioms diese Unterteilung, in der die Proben aus Gruppe (2) und (3) neuen Gruppen zugeteilt wurden. OP-Tag-Gruppe (1) bestand aus denselben Proben wie die zuvor erwähnte Gruppe (1), da alle noch am ersten Lebenstag operiert wurden. OP-Tag-Gruppe (2) bestand aus Proben von Appendices, die vor dem 28. Lebenstag entnommen wurden, OP-Tag-Gruppe (3) aus Proben von Appendices die am oder nach dem 28. Lebenstag entnommen worden sind. OP-Tag-Gruppe (4) stimmte

wieder mit der zuvor genannten Gruppe (4) überein. Tabelle 2 gibt einen Überblick.

OP-Tag-Gruppen	Anzahl	OP-Tag
OP-Tag-Gruppe (1)	11	0d
OP-Tag-Gruppe (2)	13	<28d
OP-Tag-Gruppe (3)	16	≥28d
OP-Tag-Gruppe (4)	16	5-10a

Tabelle 2: Übersicht über OP-Tag-Gruppen

2.2 Mikrobiom Analyse

2.2.1 DNA Isolation und PCR Amplifikation

Die Appendixproben wurden in einem MagNA Lyser Instrument mittels MagNA Lyser Green Beads (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) homogenisiert und die bakterielle DNA mittels PowerLyzer® PowerSoil® DNA Isolation Kits (Mo Bio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA) extrahiert. Die DNA-Konzentration wurde zunächst mit einem Nanodrop ND 1000 Spektrophotometer (Peqlab Biotechnology, Erlangen, Deutschland) bestimmt, anschließend indem man das Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) verwendete nochmals bestimmt und mittels eines Fluorometers (Synergy4, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) gemessen. Mit dem Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurde bakterielle 16S rRNA amplifiziert indem man Fusionsprimer mit der für den zu amplifizierenden Bereich spezifischen Sequenz F27-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG und R357-CTGCTGCCTYCCGTA verwendete. Eine für die Proben spezifische Nucleotid-Sequenz wurde auf Primer F27 eingefügt, um die gleichzeitige Analyse mehrerer Proben während des Sequenzierens zu ermöglichen. Um etwaige Kontaminationen bei Entnahme der Proben, deren Verarbeitung, Vorbereitung oder während der Analyse ebenfalls zu bestimmen wurden aus dem Rand des Paraffins, das die Appendices der Gruppen (1) und (2) umgab, Proben entnommen und ebenfalls sequenziert. Diese werden fortan als Leerwerte der jeweiligen Gruppe bezeichnet.

Für die PCR Amplifikation wurde für jede Probe 25 µl einer PCR Lösung verwendet, bestehend aus 20 ng DNA pro Probe, 12,5 µl von 2 Rotor-Gene SYBR Mastermix (Qiagen) und 1 µl Primer (25 µM von Vorwärts- und Rückwärtsprimern). Beim Thermocycler erfolgte zunächst die Initialisierung mit Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten, bei allen weiteren Zyklen erfolgte die Denaturierung mit 95°C für 5 Sekunden. Danach folgten 50 Zyklen zur Primerhybridisierung und Elongation zwischen 65°C und 55°C mit einer Reduktion der Temperatur um 1°C bei jedem zweiten Zyklus. Die Schmelzkurve wurde von 55°C auf 95°C erhitzt, mit einer Zunahme von 1°C alle 5 Sekunden. Im letzten Schritt wurden 25°C für 5 Minuten eingestellt.

Die PCR Produkte wurden auf einem 2% SeaKem ME Agarose-Gel (Cambrex, Rockland, ME, USA) getrennt. Spezifische Banden (ca. 450 bp) wurden entfernt, mittels des Qiagen Gelextraktions-Kit (Qiagen) gel-extrahiert und in 30 µl Aqua dest. aufgelöst.

Die Konzentrationen von amplifizierter DNA wurden mittels Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Life Technologies) bestimmt. Die Sequenzierung erfolgte durch einen Ion PGM Sequencer (Life Technologies) mittels Ion Sequencing 400 Kit (Life Technologies).

2.2.2 Sequenz-Analyse

Um Fehler in der Amplicon-Sequenzierung auszugleichen, wurde die Acacia Error Correction (Acacia Fehlerkorrektur) angewendet. Acacia korrigiert Fehler nach der Sequenzierung indem es alle Reads in gewissen Cluster zusammenführt, ihre Unterschiede statistisch bestimmt und Sequenzierungsfehler, wie unterschiedlich lange Homopolymere als Folge von Basen Insertionen oder Deletionen, korrigiert (Bragg, Stone et al. 2012).

Ein Usearch Algorithmus wurde angewandt, um Chimären zu entdecken, die anschließend vom Sequenz-File entfernt wurden. Das entstandene BAM-File, ein Dateiformat zur Speicherung von Sequenzen, wurde in den QIIME (v1.8.0) 16S Workflow (www.qiime.org) eingebracht. QIIME steht dabei für *Quantitative Insights Into Microbial Ecology*. Die Sequenzen werden hierbei nach Ähnlichkeiten in

Gruppen zusammengefasst, wobei eine 97%ige Übereinstimmung als Schwelle verwendet wird, was ungefähr der Spezies-Ebene entspricht (OTU picking script). Für jeden entstandenen Cluster von Sequenzen (Operational Taxonomic Unit, OTU) wurde die repräsentierende Sequenz bestimmt und einer bekannten Sequenz zugeordnet unter Benützung des Ribosomal Database Project (RDP) Classifiers (<http://rdp.cme.msu.edu/>) (assign taxonomy script). Anschließend wurden mit diversen Scripts OTU Tabellen erstellt, die Alpha-Diversität (z.B. die Anzahl an OTUs) und die Beta-Diversität (z.B. interindividuelle Variabilität) berechnet und visualisiert (make_otu_tablescript, core diversity script). Gruppenunterschiede wurden mittels ADONIS-Test bestimmt, während die Unterschiede der OTU Frequenzen durch den Kruskal-Test bestimmt wurden. Die Sequenz-Analyse wurde durchgeführt von Dr. Karl Kashofer, Institut für Pathologie der medizinischen Universität Graz.

3 Ergebnisse

3.1 Überblick über die Verteilung

Über alle untersuchten Proben neonataler Appendices und der für die Gruppen (1) und (2) bestimmten Leerwerte hinweg konnten insgesamt 19 verschiedene Bakterienstämme und 2 unterschiedliche Archaeenstämme identifiziert werden, wobei manche nur in kleinsten Mengen zu finden waren. Abbildung 1 gibt einen ersten Überblick über die Verteilung der Bakterienstämme zwischen den einzelnen Proben beziehungsweise den vier Gruppen, wobei zu beachten ist, dass in den ersten beiden Gruppen die zu den Proben jeweils korrespondierenden Leerwerte neben ihrer Probe zu finden sind und diese Gruppen daher eine größere Anzahl an Balken aufweisen.

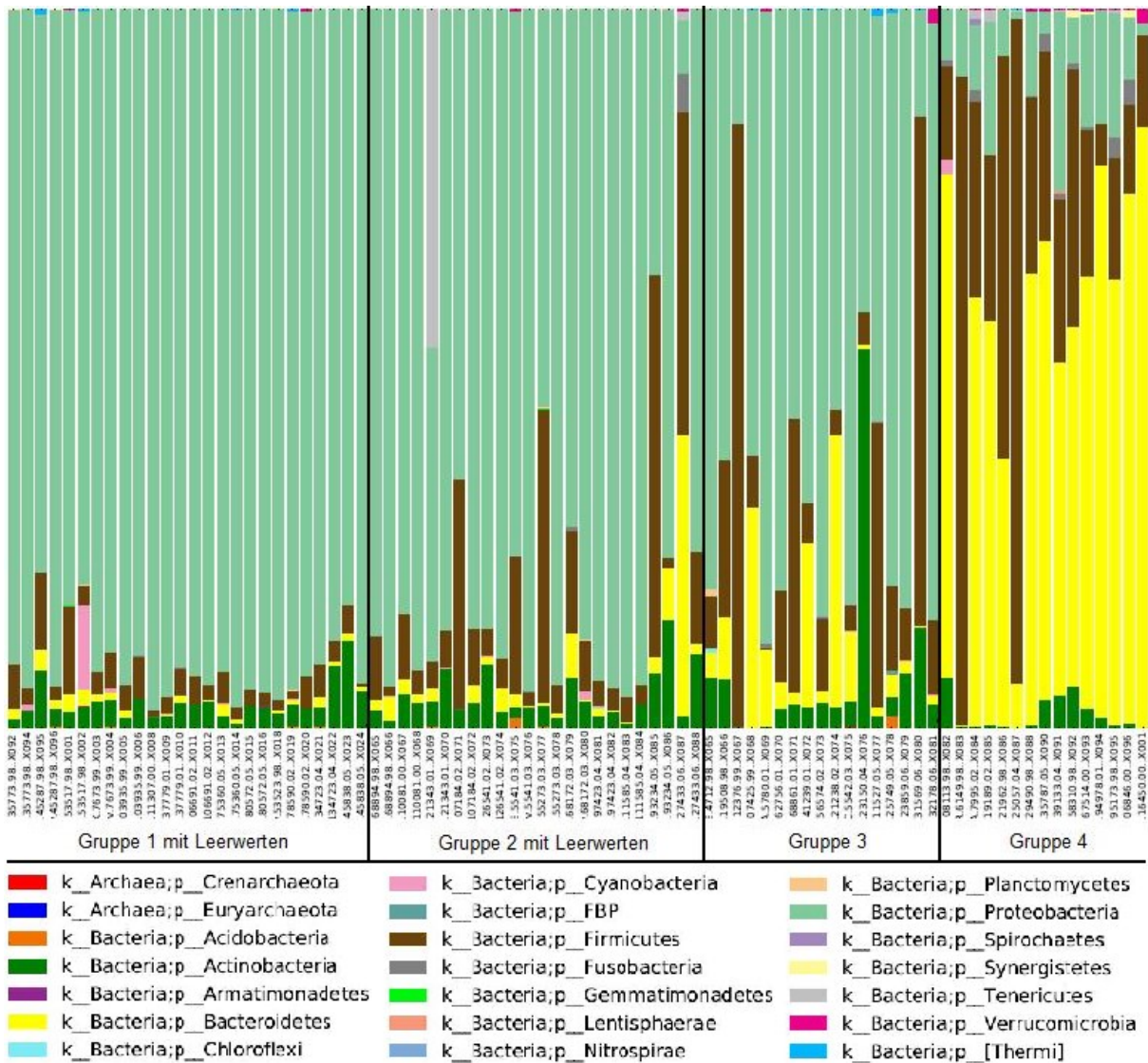


Abbildung 1: Verteilung der Bakterien- und Archaeenstämmen über alle Proben und Gruppen

Von allen hier genannten Stämmen gab es allerdings nur fünf, die zumindest in einer Gruppe auf eine mittlere Verteilung von über 1% kamen. Dies waren die Stämme der *Actinobakterien*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobakterien* und die nur in Gruppe (2) mit über einem Prozent vorkommenden *Tenericutes*. Alle weiteren Ergebnisse werden sich daher vor allem auf die ersten vier hier genannten Bakterienstämmen beziehen.

3.2 ADONIS-Test

Im durchgeführten ADONIS-Test (Tabelle 3) wurden die Proben anhand der zuvor eruierten Daten wie Geschlecht, Gewicht, OP-Tag, Gewicht bei OP, der definierten Gruppen, der Entbindungsart, den Grund für die OP oder der oralen Nahrungsaufnahme in Kategorien eingeteilt und anschließend statistische Unterschiede innerhalb dieser Kategorien errechnet.

Kategorie	Determinationskoeffizient	p-Wert
Gruppe (1) zu Leerwerte_Gruppe (1)	0.0407	0.471
Gruppe (2) zu Leerwerte_Gruppe (2)	0.10736	0.012
Gruppen nach OP Tagen	0.34704	0.001
Gruppen ohne Neutrophile	0.31914	0.001
Geschlecht	0.00762	0.811
Schwangerschaftswoche bei Entbindung	0.01404	0.87
Geburtsgewicht	0.01275	0.906
OP-Gewicht	0.02263	0.592
OP-Tag nach Geburt	0.09009	0.004
Entbindungsart	0.03648	0.148
Grund für OP	0.7435	0.001
Orale Nahrungsaufnahme vor OP	0.10529	0.002
Muttermilch	0.0466	0.514

Tabelle 3: ADONIS-Test mit Determinationskoeffizienten und p-Wert

Es zeigte sich, dass sich Gruppe (1) statistisch nicht signifikant (p -Wert $>0,47$) von den ebenfalls getesteten Leerwerten derselben Gruppe unterscheidet. Dies wird in Abbildung 2 mit Hilfe einer PCoA (PrincipalCoordinates Analysis, Hauptkomponentenanalyse) verdeutlicht, in der man sehen kann, dass die Cluster der beiden Gruppen [Gruppe (1) und Leerwerte_Gruppe (1)] keine Unterschiede zeigten, dass sie also dieselbe Verteilung an Bakterien aufweisen.

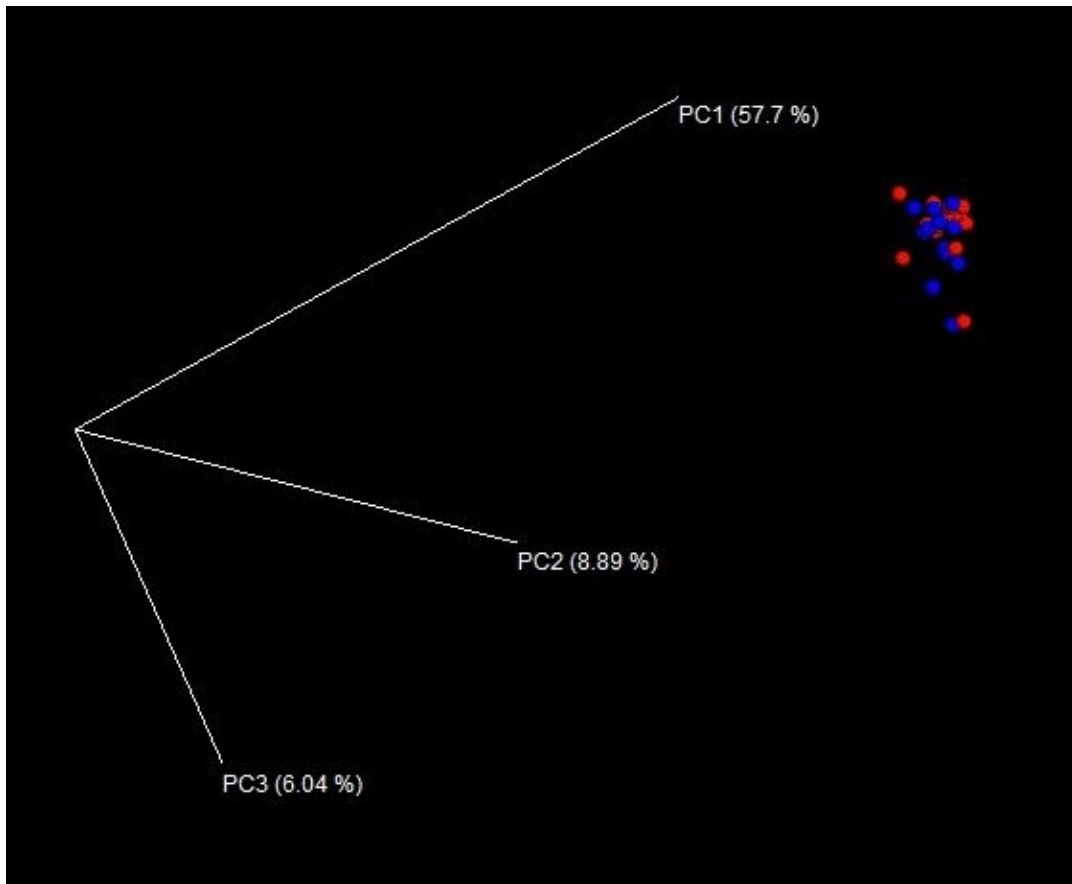


Abbildung 2: PCoA der Gruppe (1) [blau] zu Leerwert_Group (1) [rot]

Im Gegensatz hierzu zeigte der Vergleich der Gruppe (2) mit den dazugehörigen Leerwerten statistisch signifikante Unterschiede (siehe Tabelle 3) In diesem Fall zeigt die PCoA (Abbildung 3) zwei deutlich voneinander zu unterscheidende Cluster; die Verteilung der Bakterien in diesen beiden Gruppen war demnach unterschiedlich.

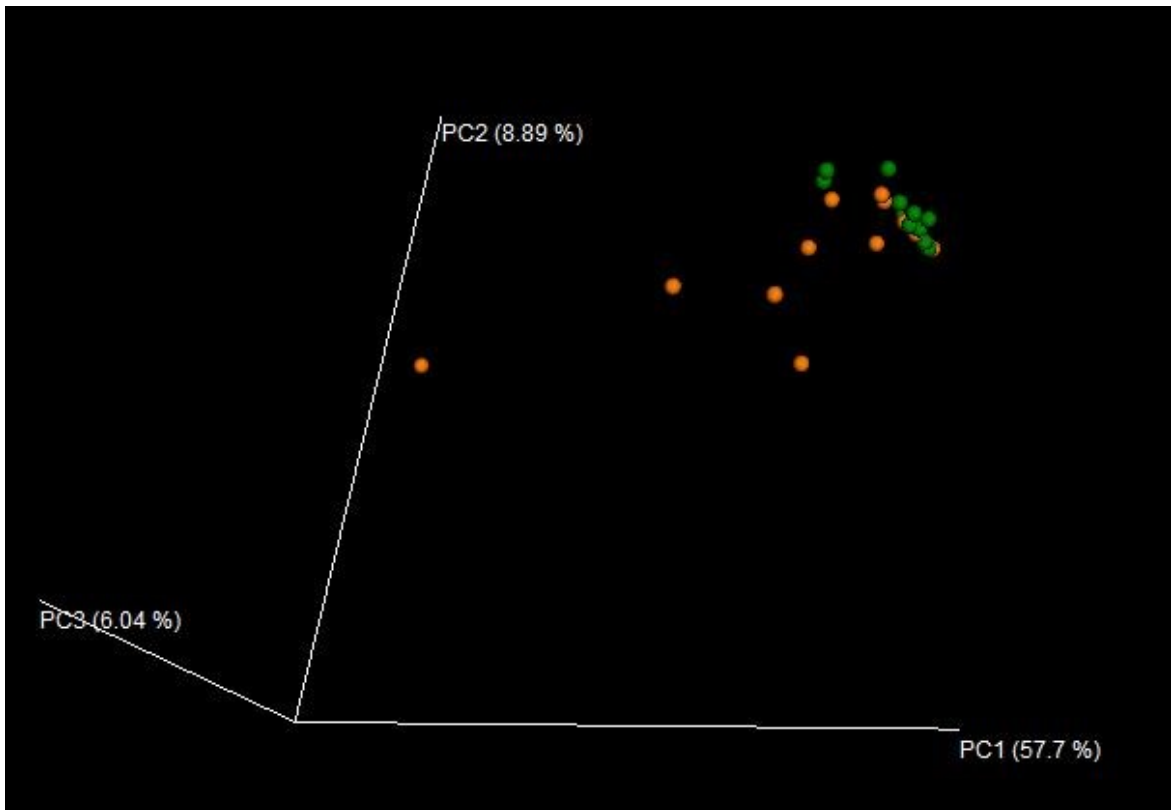


Abbildung 3: PCoA Gruppe (2) [orange] zu Leerwert_Gruppe (2) [grün]

Der Vergleich der vier im Vorfeld definierten Gruppen (siehe Tabelle 1) wurde durchgeführt, indem alle Proben, die histologisch Neutrophile aufwiesen nicht in die Analyse inkludiert wurden, da dies einen Hinweis auf einen entzündlichen Prozess liefert und das Ziel der Studie die Identifikation des Mikrobioms entzündungsfreier neonataler Appendices war. Auch hier zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied (siehe Tabelle 3) zwischen den vier Gruppen, was in der PCoA von Abbildung 4 verdeutlicht wird. Diese vier Gruppen unterschieden sich demnach deutlich in der Verteilung der in ihnen enthaltenen bakteriellen Stämme und daher in ihrem Mikrobiom.

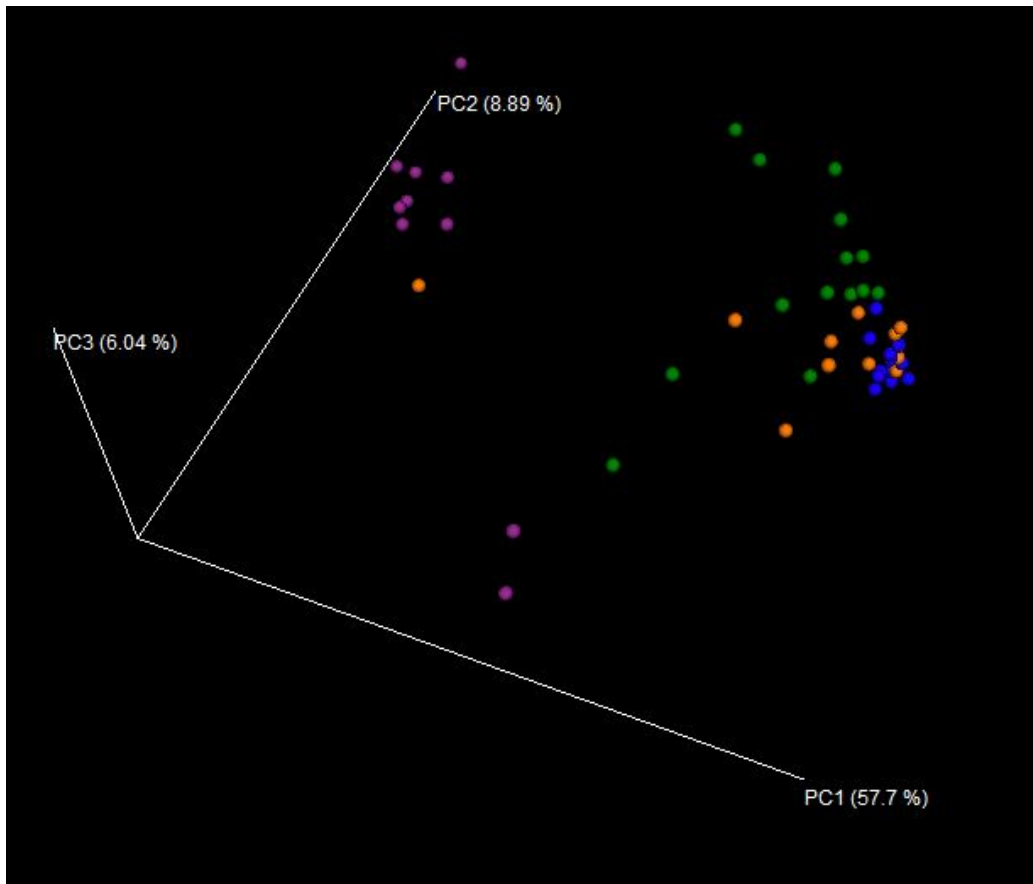


Abbildung 4: PCoA Gruppen ohne Neutrophile: Gruppe (1) blau, Gruppe (2) orange, Gruppe (3) grün, Gruppe (4) violett

Die zweite von uns getroffene Gruppengliederung nach OP-Tagen (siehe Tabelle 2) ergab im ADONIS-Test ebenfalls einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den vier Gruppen. Unterschiede wurden außerdem bei Proben gezeigt, bei denen es vor der Operation zu einer oralen Nahrungsaufnahme gekommen war und bei den verschiedenen Gründen für die Operation. Diesen Umstand kann man sich aber leicht damit erklären, dass die Gründe für die Operationen eng mit der Gruppeneinteilung zusammenhängen und daher kein kausaler Zusammenhang mit der Verteilung der Bakterien anzunehmen ist. Operationen auf Grund einer Gastroschisis beziehungsweise Omphalozele wurden zum Beispiel ausschließlich in Gruppe (1) durchgeführt. Keine statistisch signifikanten Unterschiede zeigten sich beim Geschlecht, bei der Schwangerschaftswoche zum Zeitpunkt der Geburt, beim Geburtsgewicht, beim Operationsgewicht, bei der Entbindungsart oder bei der präoperativen Zufuhr von Muttermilch (siehe Tabelle 3).

3.3 Verteilung der wichtigsten Bakterien in den Gruppen

Die bakterielle Verteilung war bei allen Gruppen unterschiedlich. Die am häufigsten vorkommenden Stämme waren *Actinobakterien*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* und *Proteobakterien*, allerdings in sich ständig ändernden Häufigkeiten je nach Gruppe. Abbildung 5 zeigt die Veränderung der Verteilungen über die vier Gruppen, Tabelle 4 gibt die Mittelwerte der oben genannten vier hauptsächlich vorkommenden bakteriellen Stämme für alle vier Gruppen an. *Proteobakterien* waren in Gruppe (1) bis (3) der dominierende Stamm, in Gruppe (4) waren *Bacteroidetes* die am häufigsten vorkommenden Bakterien. Es zeigte sich eine stetige Abnahme der *Proteobakterien* von 91,09% in Gruppe (1) bis auf 10,47% in Gruppe (4). Die Stämme *Bacteroidetes* und *Firmicutes* zeigten hingegen eine stetige Zunahme. Die mittlere Verteilung des Stammes der *Bacteroidetes* nahm vor allem von Gruppe (3) auf (4) massiv zu und erreichte in Gruppe (4) eine mittlere Verteilung von 54,70%. *Firmicutes* steigerten ihren mittleren Anteil hingegen kontinuierlich von Gruppe (1) (4,52%) bis Gruppe (4) (31,32%). Der Stamm der *Actinobakterien* blieb über alle Gruppen gesehen immer in etwa auf gleichem Niveau mit Schwankungen zwischen 1,89% und 6,77%.

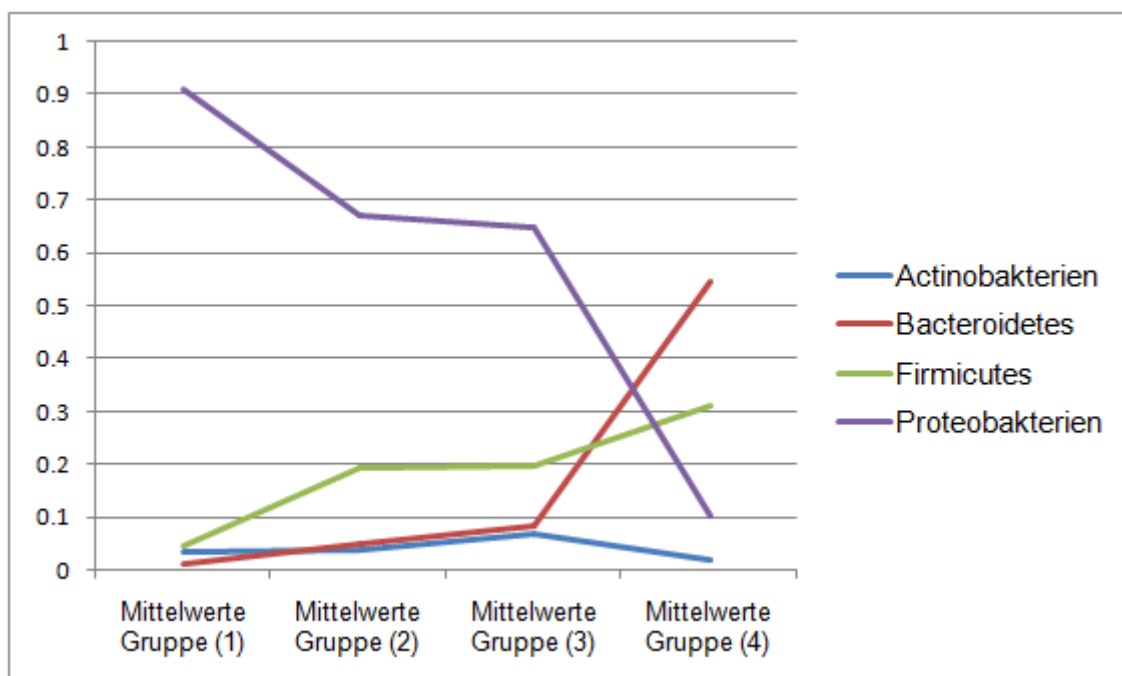


Abbildung 5: Verteilung der bakteriellen Stämme über die vier Gruppen

	M_Gruppe (1)	M_Gruppe (2)	M_Gruppe (3)	M_Gruppe (4)
Actinobakterien	0.0329	0.0375	0.0677	0.0189
Bacteroidetes	0.0101	0.0486	0.0822	0.5470
Firmicutes	0.0452	0.1942	0.1984	0.3132
Proteobakterien	0.9109	0.6715	0.6473	0.1047

Tabelle 4: Mittelwerte (M) der hauptsächlich vorkommenden bakteriellen Stämme über die vier Gruppen

3.3.1 Verteilung der Bakterien in Gruppe (1)

Gruppe (1) bestand aus Proben von Appendices, die noch am ersten Lebenstag entnommen worden sind, ohne präoperative orale Nahrungszufuhr (siehe Tabelle 1). Die am häufigsten vorkommenden Bakterien waren mit 91,09% jene vom Stamm der *Proteobakterien*. Diese kamen in jeder der 11 Proben von Gruppe (1) am häufigsten vor. Alle weiteren Bakterien nahmen einen bei weitem geringeren Anteil ein. In absteigender Reihenfolge waren dies die Bakterien der Stämme *Firmicutes* (4,52%), *Actinobakterien* (3,29%) und *Bacteroidetes* (1,01%) (siehe Tabelle 4).

3.3.2 Verteilung der Bakterien in Gruppe (2)

Gruppe (2) bestand aus Proben von Appendices von Frühgeborenen, die zum Zeitpunkt der Entnahme ein Operationsgewicht von unter 1500 Gramm besaßen (siehe Tabelle 1). In 9 von 12 Proben war der Bakterienstamm mit dem größten Anteil jener der *Proteobakterien* mit einem über die gesamte Gruppe gerechneten durchschnittlichen Wert von 67,15%. In 2 der 12 Proben waren *Firmicutes* die dominierenden Bakterien, über die gesamte Gruppe ergab sich für *Firmicutes* ein Mittelwert von 19,42%. *Bacteroidetes* (4,86%) und *Actinobakterien* (3,75%) waren nur mit geringen Anteilen vorhanden (siehe Tabelle 4). Überraschenderweise war in einer der 12 Proben von Gruppe (2) der dominierende bakterielle Stamm jener der *Tenericutes*. In dieser einen Probe hatte er einen Anteil von 47,89%, über die gesamte Gruppe gerechnet ergab diesen eine mittlere Verteilung von 4,1%. Allerdings kamen *Tenericutes* in kaum einer anderen Probe und wenn, dann nur in geringsten Mengen vor.

3.3.3 Verteilung der Bakterien in Gruppe (3)

Gruppe (3) bestand aus Proben von Appendices von Früh- und Neugeborenen beziehungsweise Säuglingen, die zum Zeitpunkt der Entnahme ein Operationsgewicht zwischen 1500 Gramm und 3900 Gramm besaßen und fast immer zuvor oral Nahrung aufgenommen hatten (siehe Tabelle 1). Auch hier waren mit einem durchschnittlichen Anteil von 64,73% *Proteobakterien* die dominierenden Bakterien. In 14 von 17 Proben waren sie die Bakterien mit dem größten Anteil. In zwei Proben dominierte der Bakterienstamm *Firmicutes*, welcher einen Durchschnittswert von 19,84% aufwies. *Bacteroidetes* (8,22%.) gefolgt von *Actinobakterien* (6,77%) verdoppelten ihre Anteile im Vergleich zur Vorgruppe. Letztere hatten in einer Probe (53,72%) den größten Anteil inne (siehe Tabelle 4).

3.3.4 Verteilung der Bakterien in Gruppe (4)

Gruppe (4) bestand aus Proben von Appendices, die Kindern im 5. bis 10. Lebensjahr entnommen worden waren (siehe Tabelle 1). Hier zeigte sich eine deutlich andere bakterielle Verteilung. Der Stamm der *Bacteroidetes*, der in den anderen 3 Gruppen keine Mittelwerte über 9% gezeigt hatte, war in Gruppe (4) mit durchschnittlich 54,7% der dominierende Stamm. In 13 von 16 Proben kam er am häufigsten vor. In den anderen drei Proben dominierten *Firmicutes*, die durchschnittlich 31,32% der Bakterien ausmachten. Gefolgt wurden diese zwei Stämme von den *Proteobakterien* (10,47%) und den *Actinobakterien* (1,89%) (siehe Tabelle 4).

3.3.5 Verteilung der Bakterien in den Leerwert-Gruppen

Die Leerwert-Proben der Gruppen (1) und (2) zeigten keine wesentlichen Unterschiede, wie Abbildung 6 verdeutlicht. *Proteobakterien* waren die hauptsächlich vorkommenden Bakterien mit einem Anteil von zirka 90%. Innerhalb des Stammes der *Proteobakterien* waren es vor allem Bakterien der Ordnung *Pseudomonadales* (50,46%-56,2%) und *Burkholderiales* (27,59%-33,49%), die den Hauptanteil ausmachten. Dies sind Bakterien, die häufig als Verunreinigung bei Mikrobiom-Analysen zu finden sind und in den Leewerten, die als Kontrolle einer möglichen Kontamination der Proben bestimmt wurden, erwartet wurden.

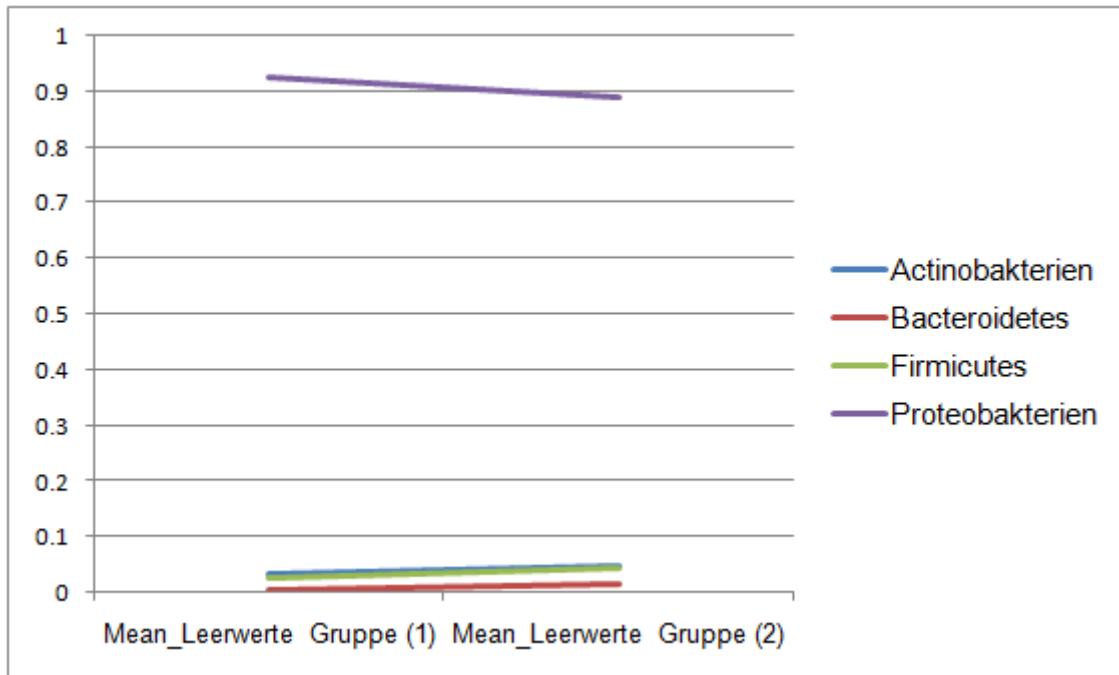


Abbildung 6: Bakterielle Verteilung in den Leerwerten der Gruppe (1) und (2)

Wie bereits erwähnt, ähnelte sich die bakterielle Verteilung der Gruppe (1) und der Leerwerte der Gruppe (1) sehr; die bakterielle Verteilung zwischen der Gruppe (2) und der dazugehörigen Leerwerte wies allerdings deutliche Unterschiede auf. Dieser Umstand wird in Abbildung 7 noch einmal verdeutlicht, in der man den Verlauf der bakteriellen Verteilung über alle vier Standardgruppen und deren korrespondierenden Leerwert-Gruppen sieht.

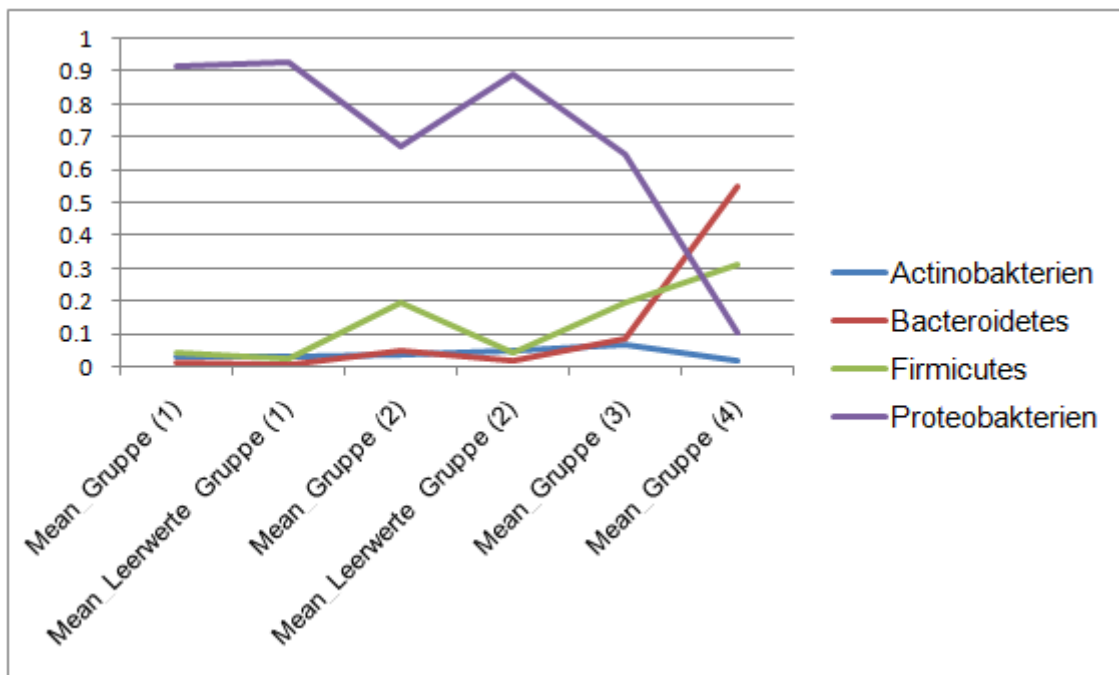


Abbildung 7: Bakterielle Verteilung über alle Gruppen und Leerwerte

3.4 Änderung der bakteriellen Verteilung

Die vier am häufigsten vorkommenden bakteriellen Stämme zeigten unterschiedliche Verläufe was ihre Anteile in den Gruppen und damit auch im zeitlichen Verlauf angeht. Im folgenden Abschnitt werden diese zeitlichen Verläufe anhand der vier oben erwähnten Bakterien gezeigt.

3.4.1 Verteilung der Proteobakterien

Die Häufigkeit von *Proteobakterien* nahm von Gruppe (1) bis Gruppe (4) kontinuierlich ab. Der durchschnittliche Anteil an *Proteobakterien* betrug in Gruppe (1) 91,09%, wobei die Werte von 77,9% bis 96,68% reichten und sich die Mehrzahl der Werte um den Median sammelten. In den Gruppen (2) und (3) zeigte dieser Bakterienstamm allerdings größere Schwankungen in den einzelnen Proben. In Gruppe (2) zum Beispiel zeigten sich Werte zwischen 7,55% und 96,25% und eine größere Streuung um den Median als noch in Gruppe (1). In Gruppe (4) sank die mittlere Verteilung auf 10,47%, die Mehrzahl der Werte war wieder um den Median zu finden. Eine Übersicht über die Verteilung der *Proteobakterien* über alle Gruppen zeigen Abbildung 8 und Tabelle 5.

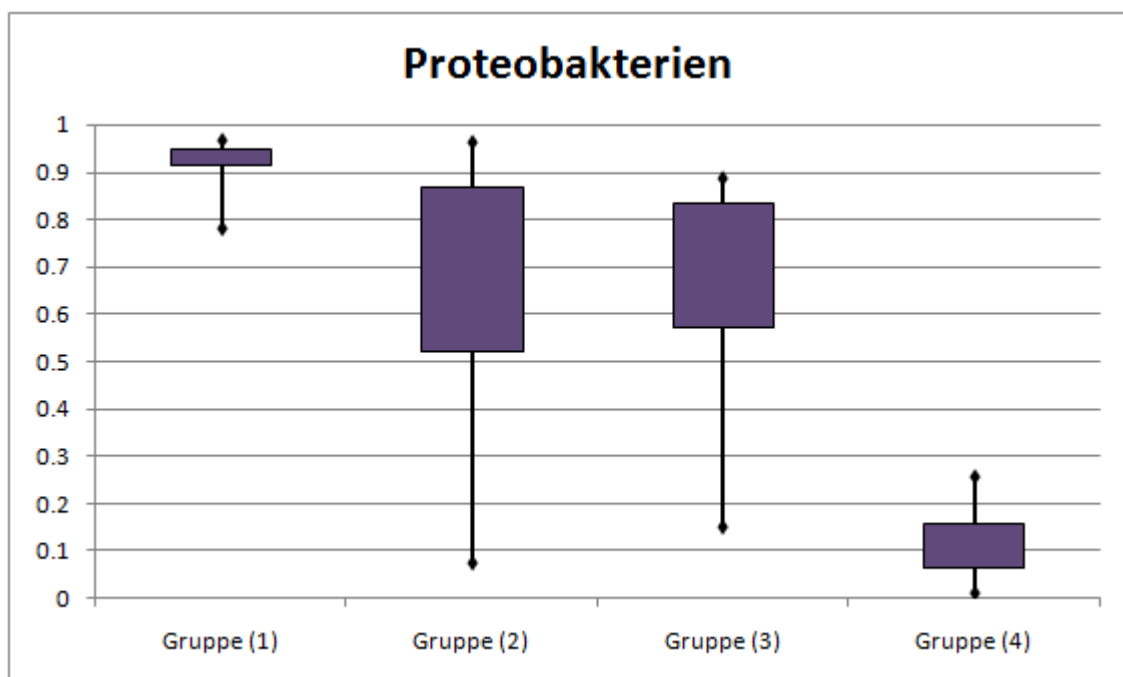


Abbildung 8: Boxplot der *Proteobakterien* über alle Gruppen

<i>Proteobakterien</i>	3. Quartil	Max	Min	1. Quartil	Median	Mean
Gruppe (1)	0.9478	0.9668	0.7790	0.9126	0.9270	0.9109
Gruppe (2)	0.8659	0.9625	0.0755	0.5224	0.7456	0.6715
Gruppe (3)	0.8319	0.8850	0.1492	0.5713	0.6848	0.6473
Gruppe (4)	0.1568	0.2580	0.0109	0.0631	0.0882	0.1047

Tabelle 5: Verteilung der *Proteobakterien* über alle Gruppen

3.4.2 Verteilung der *Bacteroidetes*

Der Stamm der *Bacteroidetes*, der in den ersten Gruppen kaum zu finden war, war in Gruppe (4) mit einem durchschnittlichen Wert von 54,7% der dominante Bakterienstamm. Er wies hier aber in den einzelnen Proben deutliche Schwankungen auf. In manchen Proben war er auch hier kaum zu finden (Minimalwert bei 0,08%), in anderen stellte er mit 84% die deutliche Mehrheit. In Gruppen (1) bis (3) hielten *Bacteroidetes* nur einen durchschnittlichen Anteil von 1,01% bis 8,22%. In Gruppen (2) und (3) fand man Schwankungen nach oben, sodass der Mittelwert dieser Gruppen nicht die tatsächliche mittlere Verteilung angab und die Mediane (1,58% bis 2,97%), um die es eine geringe Streuung der restlichen Werte gab, den tatsächlich vorliegenden Anteil besser angaben. Eine Übersicht über die Verteilung der *Bacteroidetes* über alle Gruppen zeigen Abbildung 9 und Tabelle 6.

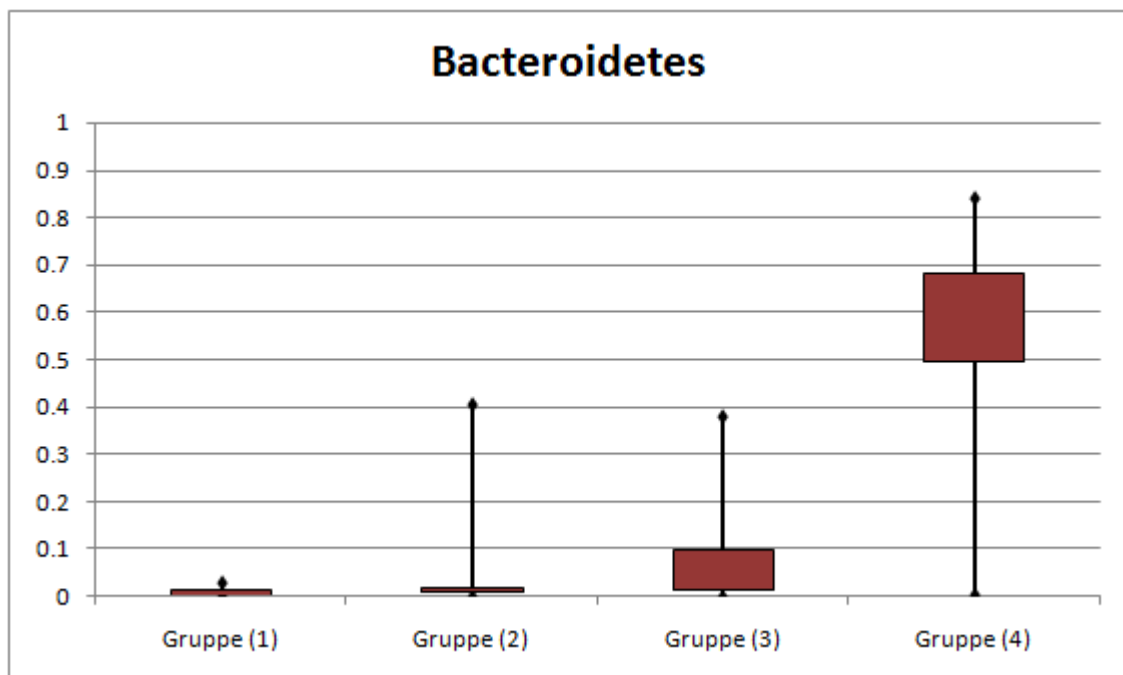


Abbildung 9: Boxplot der *Bacteroidetes* über alle Gruppen

<i>Bacteroidetes</i>	3. Quartil	Max	Min	1. Quartil	Median	Mean
Gruppe (1)	0.0140	0.0291	0.0000	0.0020	0.0096	0.0101
Gruppe (2)	0.0193	0.4035	0.0006	0.0084	0.0158	0.0486
Gruppe (3)	0.0990	0.3809	0.0004	0.0125	0.0297	0.0822
Gruppe (4)	0.6795	0.8400	0.0008	0.4936	0.6181	0.5470

Tabelle 6: Verteilung der *Bacteroidetes* über alle Gruppen

3.4.3 Verteilung der *Firmicutes*

Firmicutes zeigten im Gegensatz zu den *Bacteroidetes* eine kontinuierlichere Steigerung ihres prozentuellen Anteils über die vier Gruppen hinweg. Waren sie in Gruppe (1) mit einem durchschnittlichen Anteil von 4,52% und geringer Schwankung der einzelnen Anteile in den Proben noch kaum vorhanden, steigerte sich ihr Anteil von Gruppe zu Gruppe, sodass sie in Gruppe (4) eine mittlere Verteilung von 31,32% ausmachten und damit in der letzten Gruppe den zweithäufigsten Bakterienstamm repräsentierten. Auch in den restlichen drei Gruppen waren die *Firmicutes* hinter den *Proteobakterien* die am zweithäufigsten vorkommenden Bakterien. Besonders der Bakterienstamm der *Firmicutes* zeigte in den Gruppe (2) bis (4) große Schwankungen, vor allem nach oben: In 7 der 56 Proben waren *Firmicutes* der dominierende bakterielle Stamm. Durch den in wenigen Proben mit bis zu 92,6% weit über den Durchschnitt liegenden Anteil kam es zu einer Verschiebung des Mittelwerts nach oben, sodass auch in den Gruppen (2) bis (4) der Median (10,16% bis 22,12%) die tatsächliche mittlere Verteilung der *Firmicutes* über die 4 Gruppen besser angab. Gruppe (2) zeigte die größte Streuung um den Median. Eine Übersicht über die Verteilung der *Firmicutes* über alle Gruppen zeigen Abbildung 10 und Tabelle 7.

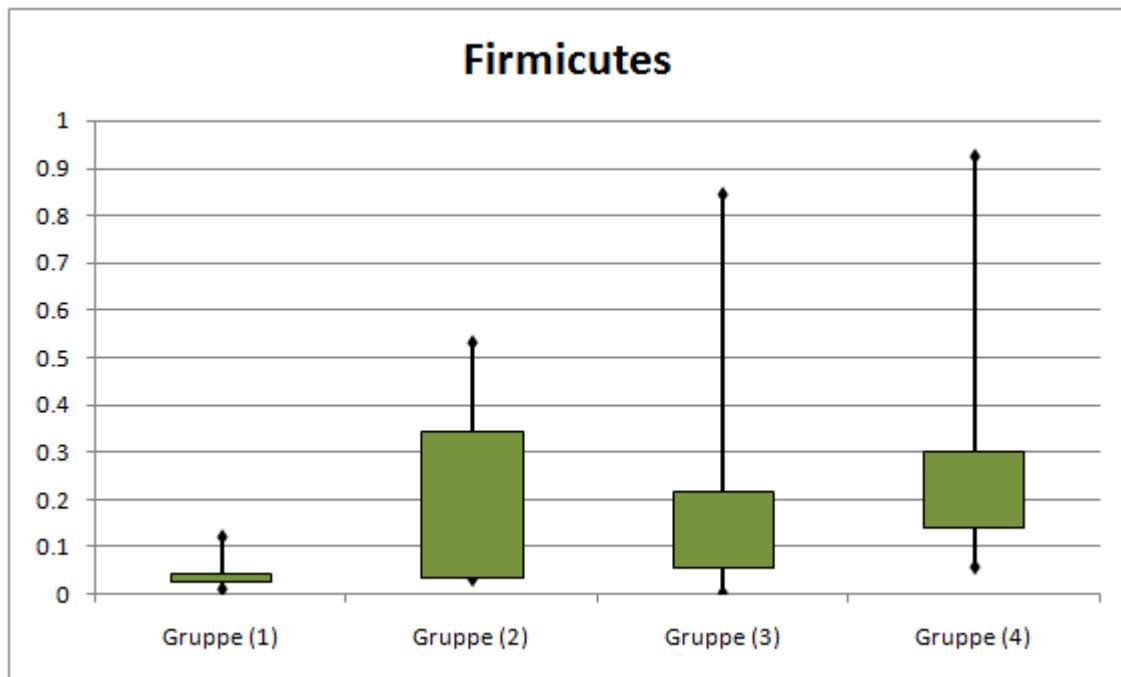


Abbildung 10: Boxplot der *Firmicutes* über alle Gruppen

<i>Firmicutes</i>	3. Quartil	Max	Min	1. Quartil	Median	Mean
Gruppe (1)	0.0436	0.1223	0.0118	0.0257	0.0380	0.0452
Gruppe (2)	0.3430	0.5302	0.0316	0.0362	0.1126	0.1942
Gruppe (3)	0.2170	0.8426	0.0022	0.0549	0.1016	0.1984
Gruppe (4)	0.3014	0.9260	0.0573	0.1415	0.2212	0.3132

Tabelle 7: Verteilung der *Firmicutes* über alle Gruppen

3.4.4 Verteilung der *Actinobakterien*

Der Bakterienstamm der *Actinobakterien* war über alle 4 Gruppen gesehen am konstantesten. Die mittlere Verteilung an *Actinobakterien* schwankte nur geringfügig. Betrug diese in Gruppe (1) 3,29%, so steigerte sie sich bis Gruppe (3) auf 6,77%. In Gruppe (4) war ihre mittlere Verteilung mit 1,8% am geringsten, über alle Gruppen gesehen zeigten sich somit allerdings keine wesentlichen Veränderungen. In den Gruppen (1), (2) und (4) zeigten sich zudem in den einzelnen Proben keine großen Schwankungen; alle Werte waren um den jeweiligen Median konzentriert. Nur in Gruppe (3) fiel eine Probe auf, in der die *Actinobakterien* mit 53,72% sogar den dominanten Bakterienstamm stellten und somit auch den Mittelwert nach oben verschoben. Hier entspricht wieder der Median der eigentlich vorherrschenden Verteilung. Eine Übersicht über die Verteilung der *Firmicutes* über alle Gruppen zeigen Abbildung 11 und Tabelle 8.

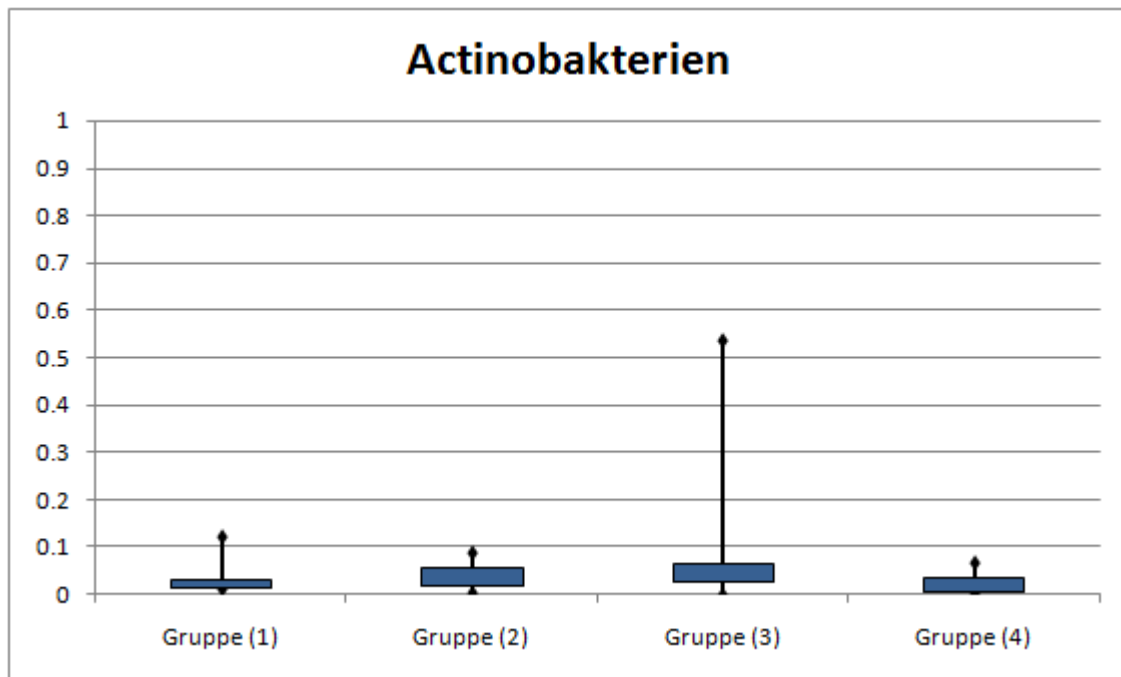


Abbildung 11: Boxplot der *Actinobakterien* über alle Gruppen

<i>Actinobakterien</i>	3. Quartil	Max	Min	1. Quartil	Median	Mean
Gruppe (1)	0.0299	0.1214	0.0124	0.0153	0.0228	0.0329
Gruppe (2)	0.0543	0.0882	0.0044	0.0173	0.0269	0.0375
Gruppe (3)	0.0642	0.5372	0.0002	0.0260	0.0295	0.0677
Gruppe (4)	0.0335	0.0662	0.0010	0.0033	0.0045	0.0189

Tabelle 8: Verteilung der *Actinobakterien* über alle Gruppen

3.4.5 Verteilung der seltener vorkommenden Bakterien

Alle anderen, seltener vorkommenden Bakterienstämme wurden nur in manchen Proben und dann auch nur mit geringsten Anteilen gefunden. Nur in einer Probe war der Bakterienstamm der *Tenericutes* die Ausnahme und war hier mit 47,89% sogar der dominante Stamm. In Gruppe (2) kamen die *Tenericutes* somit auf eine mittlere Verteilung von 4,1%, ansonsten traten sie aber kaum in Erscheinung. Kaum ein anderer bakterielle Stamm war in einer Gruppe mit über einem Prozent vertreten. Der für die Appendicitis interessante Stamm der *Fusobakterien* war kaum vertreten. Er zeigte eine Steigerung seines mittleren Anteils von 0,51% in Gruppe (2) bis 0,89% in Gruppe (4). In Gruppe (1) war er kaum messbar vertreten. Nur in fünf Proben erreichte er Anteile von über einem Prozent; sein Maximum mit 5,47% in einer Probe von Gruppe (2).

4 Diskussion

4.1 Sterilität der neonatalen Appendix

Eine der zuvor aufgestellten Thesen lautete, die neonatale Appendix müsse auf Grund des intrauterin nicht stattgefundenen Kontakts mit Bakterien steril sein. Sterilität eindeutig zu beweisen ist leider kaum möglich. In den Ergebnissen fiel auf, dass die Gruppen (1) bis (3) von Bakterien des Stammes *Proteobakterien* beherrscht wurden, wobei in diesem Stamm die Ordnungen der *Pseudomonadales* und *Burkholderiales* dominierten. Diese werden häufig als Verunreinigungen im Zuge von Mikrobiom-Analysen gefunden. Dies gibt den ersten Hinweis darauf, dass die in den ersten Gruppen gefundenen Bakterien, besonders jene der *Proteobakterien*, eher im Zuge von Verunreinigungen in die Auswertung gekommen waren und nicht physiologisch in der neonatalen Appendix zu finden sind. Um die Verunreinigung besser darstellen zu können, wurden auch Teile des Paraffins der Proben von Gruppe (1) und (2) analysiert und als Leerwerte bezeichnet. Diese Leerwert-Gruppen zeigten untereinander kaum Unterschiede, sie gaben daher sehr verlässlich die im Zuge der Vorbereitung und Verarbeitung entstandene Verunreinigung der Proben an, wodurch die Anfertigung einer Leerwert-Gruppe (3) als unnötig erachtet wurde. Auch in den Leerwert-Gruppen zeigte sich in beiden Gruppen ein dominanter *Proteobakterien*-Stamm mit den oben genannten Ordnungen im Vordergrund. Im statistischen Vergleich von Gruppe (1), die die sterilste aller Gruppen darstellen sollte, da es noch am ersten Lebenstag ohne Nahrungsaufnahme zur Operation gekommen war, mit der Leerwert-Gruppe (1) zeigte sich kein statistischer relevanter Unterschied. Die Gruppen zeigten demnach sehr ähnliche bakterielle Verteilungen. Die in Gruppe (1) gefundenen Bakterien waren daher mit großer Wahrscheinlichkeit die Folge von Verunreinigungen und spiegelten nicht die physiologische Verteilung in der neonatalen Appendix wider. Da die Verunreinigung einen so großen Anteil ausmachte, kann angenommen werden, dass nicht nur der Anteil der restlichen physiologisch vorkommenden Bakterien gering ist, sondern dass auch ihre quantitative Anzahl sehr gering und die neonatale Appendix als steril anzunehmen ist.

4.2 Entwicklung des Mikrobioms in der neonatalen Appendix

Im Vergleich von Gruppe (2), in der Frühgeborene operiert wurden, die zum Teil schon Nahrung aufgenommen hatten, mit Leerwert-Gruppe (2) zeigte sich im Gegensatz dazu ein statistisch signifikanter Unterschied. Auch hier waren immer noch *Pseudomonadales* und *Burkholderiales* die dominierenden Bakterien und es konnte davon ausgegangen werden, dass sowohl in Gruppe (2) als auch in Gruppe (3) die Verunreinigung einen wesentlichen Anteil der gefundenen Bakterien ausmachte. Dennoch zeigte der ADONIS-Test Unterschiede zwischen der Leerwert-Gruppe und Gruppe (2). Dies war ein Hinweis darauf, dass sich das Mikrobiom von Gruppe (1) und damit von der Geburt bis zu Gruppe (2) und (3) weiterentwickelt hatte und differenzierter geworden war. Vor allem die *Firmicutes* bekleideten in Gruppen (2) und (3) größere Anteile und schienen der erste Stamm zu sein, der sich in der neonatalen Appendix nach der Geburt ansiedelt. Auch die Ordnung der *Bifidobacteriales* vom Stamm der *Actinobakterien* zeigte höhere Anteile, was mit der Aufnahme von Muttermilch erklärt werden könnte. Dass der Anteil der als Verunreinigung zählenden Bakterien von Gruppe (1) auf (2) abnahm, in den korrespondierenden Leerwert-Gruppen aber fast gleich geblieben war, zeigte, dass die Erhöhung der Anteile der restlichen, wohl physiologisch vorkommenden Bakterien nicht nur auf Grund geringerer Verunreinigung sondern auf Grund einer physiologischen Entwicklung des Mikrobioms zu Stande kam und dass sich die quantitative Anzahl an Bakterien ebenfalls zwischen den Gruppen und daher im Laufe der Zeit erhöhte.

Alle vier Gruppen zeigten im ADONIS-Test statistisch signifikante Unterschiede in ihrer bakteriellen Verteilung, den größten Unterschied konnte man aber wie erwartet in Gruppe (4) beobachten. Diese bestand aus Proben von Appendices von Kindern zwischen dem 5. und 10. Lebensjahr. Mit einer deutlich erkennbaren Entwicklung des Mikrobioms unter der Annahme, dass die neonatale Appendix steril sei, war zu rechnen. In dieser letzten Gruppe dominierten die *Bacteroidetes*, die in den anderen drei Gruppen kaum in Erscheinung getreten waren. Die sicher auch in Gruppe (4) bestandene Verunreinigung spielte auf Grund der hohen quantitativen Anzahl der physiologisch vorkommenden Bakterien im Gegensatz zu Gruppen (1) bis (3) keine Rolle und veränderte das Ergebnis nicht. Der Anstieg des Anteils an *Bacteroidetes* musste zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen, als

beispielsweise jener der *Firmicutes*, zu einem Zeitpunkt der durch die getroffene Gruppeneinteilung nicht erfasst wurde. Zum Beispiel könnte die Beifügung von Beikost einen wesentlichen Effekt auf die Entwicklung des Mikrobioms haben, was aber bei sehr vielen Kindern erst nach der Entnahme der Appendix erfolgte. Der Verlauf der bakteriellen Verteilung zeigte aber eine von den Geburt an stetige Zunahme der *Firmicutes*, eine nach den ersten Monaten erfolgende starke Zunahme an *Bacteroidetes* und eine stetige Abnahme an *Proteobakterien*, die zu großen Teilen nur durch Verunreinigungen miterfasst wurden. Der Stamm der *Actinobakterien* zeigte kaum Änderungen in seinen Anteilen, was etwas verwunderlich ist, wenn man bedenkt, dass man durch die Aufnahme von Milchprodukten einen größeren Anstieg der *Bifidobakterien* und daher auch der *Actinobakterien* erwartet hätte.

4.3 Entbindungsart hat keine Auswirkung auf das Mikrobiom der Appendix

Vor der Durchführung der Studie nahm man an, dass die Entbindungsart einen Einfluss auf die Entwicklung des Mikrobioms nehmen würde. Dies begründete man mit dem im Zuge einer vaginalen Entbindung stattfindenden Kontakts mit der mütterlichen vaginalen Flora und dem im Rahmen einer Sectio weitgehend fehlenden Kontakts mit eben jener bakteriellen Besiedelung. Überraschenderweise konnte im ADONIS-Test aber kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen diese beiden Gruppen gefunden werden. Es ist daher davon auszugehen, dass die tief im Gastrointestinaltrakt gelegene, stark konservierte Struktur der Appendix nicht durch die Entbindungsart beeinflusst wird. Diese Beobachtung gilt allerdings nur für die neonatale Appendix, andere assoziierte Organe oder auch Anteile des Gastrointestinaltrakts könnten durchaus Unterschiede aufweisen.

4.4 Mikrobiom der Appendix von Kindern

Das Mikrobiom der Appendix ist bislang noch kaum erforscht. Es gab zwar schon einige Studien zum Thema neonatales, gastrointestinales Mikrobiom, diese bezogen sich aber fast immer nur auf Feces und kaum auf operativ oder invasiv entnommene Proben aus der Darmwand, wodurch meistens nur luminale, aber keine mucosa-assoziierten Bakterien erfasst worden waren. Zuvor durchgeführte

Mikrobiom-Analysen der Appendix wurden fast immer an infizierten Appendices durchgeführt, die daraus resultierenden Ergebnisse waren daher für die physiologische Appendix nicht aussagekräftig. In den bisher durchgeführten Analysen konnten bis zu 15 verschiedene Bakterienstämme gefunden werden, wobei die Stämme *Firmicutes*, *Proteobakterien*, *Bacteroidetes*, *Fusobakterien* und *Actinobakterien* die am häufigsten vorkommenden waren. Die größte Konzentration hatten hierbei die *Firmicutes* und *Proteobakterien* (Zhong, Brower-Sinning et al. 2014, Guinane, Tadrous et al. 2013). Auch in der hier durchgeführten Studie konnten mit 21 Vertretern eine Vielzahl verschiedenster Stämme gefunden werden und die Vielfältigkeit des Mikrobioms der Appendix unterstrichen werden, es zeigten sich allerdings andere bakterielle Verteilungen als in den zuvor durchgeführten Studien. Auch hier dominierten einige wenige Stämme die gesamte Verteilung. In Gruppe (4), deren Proben von nicht entzündlichen Appendices von Kindern zwischen dem 5. und 10. Lebensjahr stammten und daher am ehesten mit den Ergebnissen der anderen Studien vergleichbar waren, waren allerdings nicht *Firmicutes* die Bakterien mit der größten Konzentration, sondern *Bacteroidetes*. Die in den Vorstudien an zweiter Stelle stehenden *Proteobakterien* waren kaum noch vorhanden, *Fusobakterien* kamen in kaum einer Gruppe vor. Dies könnte einerseits ein Hinweis darauf sein, dass sich das Mikrobiom der Appendix von Kindern von jenem bei Erwachsenen stark unterscheidet und andererseits, dass sich im Falle einer Appendicitis nicht nur eine bakterielle Konzentration, sondern sich die gesamte bakterielle Verteilung ändert. Die in Gruppe (4) gefundene bakterielle Verteilung könnte, da es sich hier um Proben nicht infizierter Appendices handelt, die bisher akkurateste Angabe zum Mikrobiom der Appendix bei Kindern liefern.

4.5 Rolle der *Fusobakterien* für die *Appendicitis*

In mehreren Studien konnte eine vermehrte Konzentration an *Fusobakterien* in infizierten Appendices festgestellt werden, die in den entzündungsfreien Kontrollgruppen fehlten (Guinane, Tadrous et al. 2013, Zhong, Brower-Sinning et al. 2014, Swidsinski, Dorffel et al. 2011). In der hier durchgeführten Studie konnten *Fusobakterien* nur in den geringsten Konzentrationen in wenigen Proben festgestellt werden, über die Gruppen gesehen hatten sie einen verschwindend geringen Anteil. Da es sich hier um nicht infizierte Appendices handelte und es zu

keiner erhöhten Konzentration an *Fusobakterien* kommen sollte, deckt sich diese Beobachtungen mit den Erkenntnissen der zuvor genannten Studien. Auf die Frage ob sich *Fusobakterien* im Zuge der Entzündung erhöhen oder selbst der Ausgangspunkt der Entzündung sind, kann die vorliegende Studie keine Antwort geben. Den Verdacht eines Zusammenhangs dieser Bakterien mit der Appendizitis konnten wir auf Grund der Abwesenheit dieses bakteriellen Stammes in unseren entzündungsfreien Appendices allerdings bestätigen.

4.6 Weiterführende Untersuchungen

Auf die Auswertung einer Leerwert-Gruppe (3) wurde verzichtet, da sich die Leerwert-Gruppen (1) und (2) bereits kaum unterschieden und zu zweit bereits eine übergeordnete Leerwert-Gruppe gebildet hatten, die für die Analyse ausreichend war.

Einige Fragen blieben im Zuge dieser Arbeit unbeantwortet. Zum genaueren Verständnis der Funktion und Entwicklung des Mikrobioms der Appendix wäre die Analyse der tieferliegenden Ordnungen der hier skizzierten bakteriellen Stämme nötig, was den Rahmen der Diplomarbeit allerdings überstiegen hätte. Diesbezüglich sei auf die in Kürze erscheinende Publikation von Singer et al. verwiesen, in der noch genauer auf die Zusammensetzung der einzelnen Bakterienkonzentration in den hier definierten Gruppen und deren Bedeutung auf die Entwicklung eingegangen werden wird.

Weiterführende Studien werden nötig sein, um die Forschung auf dem Gebiet des Mikrobioms und insbesondere des neonatalen Mikrobioms fortzusetzen. Mit der hier durchgeführten Studie konnte einer der ersten Schritte in diesem noch relativen unerforschten Gebiet gemacht werden mit dessen Hilfe möglicherweise in Zukunft neonatale oder pädiatrische Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts besser verstanden und für Arzt und Patient schonender behandelt werden könnten.

5 Literaturverzeichnis

AIDY, S.E., VAN DEN BOGERT, B. and KLEEREBEZEM, M., 2014. The small intestine microbiota, nutritional modulation and relevance for health. *Current opinion in biotechnology*, **32C**, pp. 14-20.

ANDERHUBER, F., BECHMANN, I., FILLER, T.J., FUNK, R.H.W., LINSS, W., NITSCH, R., PERA, F., PEUKER, E.T., PRETTERKLIEBER, M.L., REISS, G., STREICHER, J. and WEIGLEIN, A.H., 2012. *Waldeyer - Anatomie des Menschen*. 19. edn. De Gruyter.

ANDERSSON, A.F., LINDBERG, M., JAKOBSSON, H., BACKHED, F., NYREN, P. and ENGSTRAND, L., 2008. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PloS one*, **3**(7), pp. e2836.

ANSALONI, L., CATENA, F. and PINNA, A.D., 2009. What is the function of the human vermiform appendix?. Evolution-based surgery: a new perspective in the Darwinian year 2009. *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes*, **43**(2), pp. 67-71.

ARUMUGAM, M., RAES, J., PELLETIER, E., LE PASLIER, D., YAMADA, T., MENDE, D.R., FERNANDES, G.R., TAP, J., BRULS, T., BATTO, J.M., BERTALAN, M., BORRUEL, N., CASELLAS, F., FERNANDEZ, L., GAUTIER, L., HANSEN, T., HATTORI, M., HAYASHI, T., KLEEREBEZEM, M., KUROKAWA, K., LECLERC, M., LEVENEZ, F., MANICHANH, C., NIELSEN, H.B., NIELSEN, T., PONS, N., POULAIN, J., QIN, J., SICHERITZ-PONTEN, T., TIMS, S., TORRENTS, D., UGARTE, E., ZOETENDAL, E.G., WANG, J., GUARNER, F., PEDERSEN, O., DE VOS, W.M., BRUNAK, S., DORE, J., METAHIT CONSORTIUM, ANTOLIN, M., ARTIGUENAVE, F., BLOTTIERE, H.M., ALMEIDA, M., BRECHOT, C., CARA, C., CHERVAUX, C., CULTRONE, A., DELORME, C., DENARIAZ, G., DERVYN, R., FOERSTNER, K.U., FRISS, C., VAN DE GUCHTE, M., GUEDON, E., HAIMET, F., HUBER, W., VAN HYLCKAMA-VLIEG, J., JAMET, A., JUSTE, C., KACI, G., KNOL, J., LAKHDARI, O., LAYEC, S., LE ROUX, K., MAGUIN, E., MERIEUX, A., MELO MINARDI, R., M'RINI, C., MULLER, J., OOZEER, R., PARKHILL, J., RENAULT, P., RESCIGNO, M., SANCHEZ, N., SUNAGAWA, S., TORREJON, A., TURNER, K., VANDEMEULEBROUCK, G., VARELA, E., WINOGRADSKY, Y., ZELLER, G., WEISSENBACH, J., EHRlich, S.D. and BORK, P., 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, **473**(7346), pp. 174-180.

BACKHED, F., FRASER, C.M., RINGEL, Y., SANDERS, M.E., SARTOR, R.B., SHERMAN, P.M., VERSALOVIC, J., YOUNG, V. and FINLAY, B.B., 2012.

Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell host & microbe*, **12**(5), pp. 611-622.

BACKHED, F., LEY, R.E., SONNENBURG, J.L., PETERSON, D.A. and GORDON, J.I., 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science (New York, N.Y.)*, **307**(5717), pp. 1915-1920.

BARLOW, A., MUHLEMAN, M., GIELECKI, J., MATUSZ, P., TUBBS, R.S. and LOUKAS, M., 2013. The vermiform appendix: A review. *Clinical anatomy (New York, N.Y.)*, **26**(7), pp. 833-842.

BIK, E.M., ECKBURG, P.B., GILL, S.R., NELSON, K.E., PURDOM, E.A., FRANCOIS, F., PEREZ-PEREZ, G., BLASER, M.J. and RELMAN, D.A., 2006. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**(3), pp. 732-737.

BOLLINGER, R.R., EVERETT, M.L., PALESTRANT, D., LOVE, S.D., LIN, S.S. and PARKER, W., 2003. Human secretory immunoglobulin A may contribute to biofilm formation in the gut. *Immunology*, **109**(4), pp. 580-587.

BOOIJINK, C.C., EL-AIDY, S., RAJILIC-STOJANOVIC, M., HEILIG, H.G., TROOST, F.J., SMIDT, H., KLEEREBEZEM, M., DE VOS, W.M. and ZOETENDAL, E.G., 2010. High temporal and inter-individual variation detected in the human ileal microbiota. *Environmental microbiology*, **12**(12), pp. 3213-3227.

BRAGG, L., STONE, G., IMELFORT, M., HUGENHOLTZ, P. and TYSON, G.W., 2012. Fast, accurate error-correction of amplicon pyrosequences using Acacia. *Nature methods*, **9**(5), pp. 425-426.

DAVE, M., HIGGINS, P.D., MIDDHA, S. and RIOUX, K.P., 2012. The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, **160**(4), pp. 246-257.

DAVIES, J., 2001. In a map for human life, count the microbes, too. *Science (New York, N.Y.)*, **291**(5512), pp. 2316.

DI BELLA, J.M., BAO, Y., GLOOR, G.B., BURTON, J.P. and REID, G., 2013. High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. *Journal of microbiological methods*, **95**(3), pp. 401-414.

ECKBURG, P.B., BIK, E.M., BERNSTEIN, C.N., PURDOM, E., DETHLEFSEN, L., SARGENT, M., GILL, S.R., NELSON, K.E. and RELMAN, D.A., 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science (New York, N.Y.)*, **308**(5728), pp. 1635-1638.

ELOE-FADROSH, E.A. and RASKO, D.A., 2013. The human microbiome: from symbiosis to pathogenesis. *Annual Review of Medicine*, **64**, pp. 145-163.

FIERER, N., HAMADY, M., LAUBER, C.L. and KNIGHT, R., 2008. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**(46), pp. 17994-17999.

GORGOLLON, P., 1978. The normal human appendix: a light and electron microscopic study. *Journal of anatomy*, **126**(Pt 1), pp. 87-101.

GUINANE, C.M., TADROUS, A., FOUHY, F., RYAN, C.A., DEMPSEY, E.M., MURPHY, B., ANDREWS, E., COTTER, P.D., STANTON, C. and ROSS, R.P., 2013. Microbial composition of human appendices from patients following appendectomy. *mBio*, **4**(1), pp. 10.1128/mBio.00366-12.

HAYASHI, H., TAKAHASHI, R., NISHI, T., SAKAMOTO, M. and BENNO, Y., 2005. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *Journal of medical microbiology*, **54**(Pt 11), pp. 1093-1101.

HOOPER, L.V., MIDTVEDT, T. and GORDON, J.I., 2002. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition*, **22**, pp. 283-307.

IM, G.Y., MODAYIL, R.J., LIN, C.T., GEIER, S.J., KATZ, D.S., FEUERMAN, M. and GRENDALL, J.H., 2011. The appendix may protect against *Clostridium difficile* recurrence. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical*

practice journal of the American Gastroenterological Association, **9**(12), pp. 1072-1077.

INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, **431**(7011), pp. 931-945.

KAYSER, F., BÖTTGER, E., ZINKERNAGEL, R., HALLER, O., ECKERT, J. and DEPLAZES, P., 2010. *Medizinische Mikrobiologie*. 12. edn. Stuttgart: Thieme.

KROGFELT, K.A., 1991. Bacterial adhesion: genetics, biogenesis, and role in pathogenesis of fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. *Reviews of infectious diseases*, **13**(4), pp. 721-735.

LAURIN, M., EVERETT, M.L. and PARKER, W., 2011. The cecal appendix: one more immune component with a function disturbed by post-industrial culture. *Anatomical record (Hoboken, N.J.: 2007)*, **294**(4), pp. 567-579.

LEDERBERG, J. and MCCRAY, A., 2001. 'Ome Sweet 'Omics-- A Genealogical Treasury of Words. *The Scientist*, **15**, pp. 8-9.

LEY, R.E., LOZUPONE, C.A., HAMADY, M., KNIGHT, R. and GORDON, J.I., 2008. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature reviews.Microbiology*, **6**(10), pp. 776-788.

LI, X.X., WONG, G.L., TO, K.F., WONG, V.W., LAI, L.H., CHOW, D.K., LAU, J.Y., SUNG, J.J. and DING, C., 2009. Bacterial microbiota profiling in gastritis without *Helicobacter pylori* infection or non-steroidal anti-inflammatory drug use. *PloS one*, **4**(11), pp. e7985.

NIH HMP WORKING GROUP, PETERSON, J., GARGES, S., GIOVANNI, M., MCINNES, P., WANG, L., SCHLOSS, J.A., BONAZZI, V., MCEWEN, J.E., WETTERSTRAND, K.A., DEAL, C., BAKER, C.C., DI FRANCESCO, V., HOWCROFT, T.K., KARP, R.W., LUNSFORD, R.D., WELLINGTON, C.R., BELACHEW, T., WRIGHT, M., GIBLIN, C., DAVID, H., MILLS, M., SALOMON, R., MULLINS, C., AKOLKAR, B., BEGG, L., DAVIS, C., GRANDISON, L., HUMBLE, M., KHALSA, J., LITTLE, A.R., PEAVY, H., PONTZER, C., PORTNOY, M.,

SAYRE, M.H., STARKE-REED, P., ZAKHARI, S., READ, J., WATSON, B. and GUYER, M., 2009. The NIH Human Microbiome Project. *Genome research*, **19**(12), pp. 2317-2323.

PALESTRANT, D., HOLZKNECHT, Z.E., COLLINS, B.H., PARKER, W., MILLER, S.E. and BOLLINGER, R.R., 2004. Microbial biofilms in the gut: visualization by electron microscopy and by acridine orange staining. *Ultrastructural pathology*, **28**(1), pp. 23-27.

QIN, J., LI, R., RAES, J., ARUMUGAM, M., BURGDORF, K.S., MANICHANH, C., NIELSEN, T., PONS, N., LEVENEZ, F., YAMADA, T., MENDE, D.R., LI, J., XU, J., LI, S., LI, D., CAO, J., WANG, B., LIANG, H., ZHENG, H., XIE, Y., TAP, J., LEPAGE, P., BERTALAN, M., BATTO, J.M., HANSEN, T., LE PASLIER, D., LINNEBERG, A., NIELSEN, H.B., PELLETIER, E., RENAULT, P., SICHERITZ-PONTEN, T., TURNER, K., ZHU, H., YU, C., LI, S., JIAN, M., ZHOU, Y., LI, Y., ZHANG, X., LI, S., QIN, N., YANG, H., WANG, J., BRUNAK, S., DORE, J., GUARNER, F., KRISTIANSEN, K., PEDERSEN, O., PARKHILL, J., WEISSENBACH, J., METAHIT CONSORTIUM, BORK, P., EHRLICH, S.D. and WANG, J., 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, **464**(7285), pp. 59-65.

RANDAL BOLLINGER, R., BARBAS, A.S., BUSH, E.L., LIN, S.S. and PARKER, W., 2007. Biofilms in the large bowel suggest an apparent function of the human vermiform appendix. *Journal of theoretical biology*, **249**(4), pp. 826-831.

SANDERS, N.L., BOLLINGER, R.R., LEE, R., THOMAS, S. and PARKER, W., 2013. Appendectomy and *Clostridium difficile* colitis: relationships revealed by clinical observations and immunology. *World journal of gastroenterology : WJG*, **19**(34), pp. 5607-5614.

SAVAGE, D.C., 1977. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Review of Microbiology*, **31**, pp. 107-133.

SCOTT, G.B., 1980. The primate caecum and appendix vermiformis: a comparative study. *Journal of anatomy*, **131**(Pt 3), pp. 549-563.

SERETIS, C., SERETIS, F. and GOONETILLEKE, K., 2014. Appendicectomy and clostridium difficile infection: is there a link? *Journal of clinical medicine research*, **6**(4), pp. 239-241.

SMITH, H.F., FISHER, R.E., EVERETT, M.L., THOMAS, A.D., BOLLINGER, R.R. and PARKER, W., 2009. Comparative anatomy and phylogenetic distribution of the mammalian cecal appendix. *Journal of Evolutionary Biology*, **22**(10), pp. 1984-1999.

SUERBAUM, S., HAHN, H., BURCHARD, G., KAUFMANN, S. and SCHULZ, T.:., 2012. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 7. Auflage edn. Berlin Heidelberg: Springer.

SWIDSINSKI, A., DORFFEL, Y., LOENING-BAUCKE, V., THEISSIG, F., RUCKERT, J.C., ISMAIL, M., RAU, W.A., GASCHLER, D., WEIZENEGGER, M., KUHN, S., SCHILLING, J. and DORFFEL, W.V., 2011. Acute appendicitis is characterised by local invasion with *Fusobacterium nucleatum/necrophorum*. *Gut*, **60**(1), pp. 34-40.

TURNBAUGH, P.J., HAMADY, M., YATSUNENKO, T., CANTAREL, B.L., DUNCAN, A., LEY, R.E., SOGIN, M.L., JONES, W.J., ROE, B.A., AFFOURTIT, J.P., EGHOLM, M., HENRISSAT, B., HEATH, A.C., KNIGHT, R. and GORDON, J.I., 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, **457**(7228), pp. 480-484.

URSELL, L.K., METCALF, J.L., PARFREY, L.W. and KNIGHT, R., 2012. Defining the human microbiome. *Nutrition reviews*, **70 Suppl 1**, pp. S38-44.

VAN DEN BOGERT, B., ERKUS, O., BOEKHORST, J., DE GOFFAU, M., SMID, E.J., ZOETENDAL, E.G. and KLEEREBEZEM, M., 2013. Diversity of human small intestinal *Streptococcus* and *Veillonella* populations. *FEMS microbiology ecology*, **85**(2), pp. 376-388.

WARDLAW, T., SALAMA, P., BROCKLEHURST, C., CHOPRA, M. and MASON, E., 2010. Diarrhoea: why children are still dying and what can be done. *Lancet*, **375**(9718), pp. 870-872.

WHEELER, D.A., SRINIVASAN, M., EGHOLM, M., SHEN, Y., CHEN, L., MCGUIRE, A., HE, W., CHEN, Y.J., MAKHIJANI, V., ROTH, G.T., GOMES, X., TARTARO, K., NIAZI, F., TURCOTTE, C.L., IRZYK, G.P., LUPSKI, J.R., CHINAULT, C., SONG, X.Z., LIU, Y., YUAN, Y., NAZARETH, L., QIN, X., MUZNY, D.M., MARGULIES, M., WEINSTOCK, G.M., GIBBS, R.A. and ROTHBERG, J.M., 2008. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature*, **452**(7189), pp. 872-876.

WU, W.M., YANG, Y.S. and PENG, L.H., 2014. Microbiota in the stomach: new insights. *Journal of digestive diseases*, **15**(2), pp. 54-61.

YANG, I., NELL, S. and SUERBAUM, S., 2013. Survival in hostile territory: the microbiota of the stomach. *FEMS microbiology reviews*, **37**(5), pp. 736-761.

ZHONG, D., BROWER-SINNING, R., FIREK, B. and MOROWITZ, M.J., 2014. Acute appendicitis in children is associated with an abundance of bacteria from the phylum Fusobacteria. *Journal of pediatric surgery*, **49**(3), pp. 441-446.

ZILBERSTEIN, B., QUINTANILHA, A.G., SANTOS, M.A., PAJECKI, D., MOURA, E.G., ALVES, P.R., MALUF FILHO, F., DE SOUZA, J.A. and GAMA-RODRIGUES, J., 2007. Digestive tract microbiota in healthy volunteers. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, **62**(1), pp. 47-54.