

Aus der Klinik und Poliklinik für Kinderchirurgie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Zur Pathophysiologie der akuten Appendizitis im Kindes- und  
Jugendalter –  
Ergebnisse einer vergleichenden prospektiven  
Genexpressionsuntersuchung

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Natalie Kiss  
aus Budapest

Datum der Promotion: 17.09.2021

## **Vorwort**

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden am 9. Januar 2021 als Open-Access-Publikation veröffentlicht:

Kiss, N., Minderjahn, M., Reismann, J., Svensson, J., Wester, T., Hauptmann, K., Schad, M., Kallarackal, J., von Bernuth, H. and Reismann, M. (2021) 'Use of gene expression profiling to identify candidate genes for pretherapeutic patient classification in acute appendicitis', *BJS Open*, 5(1). doi: 10.1093/bjsopen/zraa045.

## Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis .....	3
2	Abbildungsverzeichnis.....	4
3	Tabellenverzeichnis.....	4
4	Zusammenfassung.....	5
5	Einleitung.....	9
5.1	Geschichte.....	9
5.2	Epidemiologie .....	10
5.3	Anatomie.....	11
5.4	Pathophysiologie .....	12
5.4.1	Pathologie .....	12
5.4.2	Komplizierte und unkomplizierte Appendizitis.....	13
5.4.3	Immunologie der akuten Appendizitis .....	13
5.5	Diagnostik .....	15
5.5.1	Anamnese .....	15
5.5.2	Klinische Untersuchung .....	15
5.5.3	Labor .....	17
5.5.4	Bildgebung .....	18
5.5.5	Scores zur Diagnostik der akuten Appendizitis.....	19
5.5.6	Methoden des maschinellen Lernens und der künstlichen Intelligenz .....	20
5.6	Therapie.....	21
5.6.1	Aktuelle Therapiestrategien .....	21
5.6.2	Konservative Therapiestrategien .....	22
5.7	Genexpressionsanalyse in der klinischen Forschung.....	23
6	Hypothese und Zielsetzung.....	25
7	Methodik.....	26
7.1	Epidemiologie .....	26
7.2	Labor.....	27
7.3	Pathologische Untersuchung.....	27
7.4	Genexpressionsanalyse .....	28
7.4.1	Dichtegradientenzentrifugation .....	28
7.4.2	RNA-Isolierung.....	30

7.4.3	Qualitätskontrolle und Quantifizierung der RNA .....	30
7.4.4	Microarray Technik.....	31
7.5	Analyse der epidemiologischen und laborchemischen Daten .....	31
7.6	Analyse der Genexpressionsdaten.....	31
7.6.1	Quantilnormalisierung .....	31
7.6.2	Hierarchische Clusteranalyse.....	32
7.6.3	Heatmap.....	32
7.6.4	Gene Set Analysis.....	33
8	Ergebnisse .....	35
8.1	Patientenkollektiv .....	35
8.2	Laborparameter .....	36
8.3	Genexpressionsanalyse .....	37
8.3.1	Top 100 differentiell exprimierte Gene .....	40
8.3.2	Analyse der immunologisch relevanten Gene.....	41
8.3.3	Genexpressionsprofil der phlegmonösen Appendizitis .....	42
8.3.4	Genexpressionsmuster der gangränösen Appendizitis.....	45
8.3.5	Expression unspezifischer Gene.....	46
9	Diskussion .....	48
9.1	Labor.....	51
9.2	Genexpression.....	52
9.2.1	Expressionsprofil der phlegmonösen Appendizitis.....	52
9.2.2	Expressionsprofil der gangränösen Appendizitis .....	57
9.3	Schlussfolgerung .....	62
9.4	Limitationen .....	63
9.5	Ausblick .....	64
10	Literaturverzeichnis .....	65
11	Eidesstattliche Versicherung.....	84
12	Lebenslauf.....	86
13	Publikationsliste.....	87
14	Danksagung .....	88

## 1 Abkürzungsverzeichnis

CD	Cluster of Differentiation
CRP	C-reaktives Protein
E. coli	Escherichia coli
GA	Gangränöse Appendizitis
GAGE	Generally Applicable Gene-set Enrichment
GSA	Gene Set Analysis
IL	Interleukin
IRAK	Interleukin-1 receptor associated kinase
ITK	Interleukin-2 inducible T-cell kinase
LCN	Lipocalin
mRNA	messenger ribonucleic acid
NF- $\kappa$ B	nuclear factor- $\kappa$ B
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NIK	NF- $\kappa$ B-inducing kinase
NLR	NOD-like receptor
NLRC	NLR Family CARD Domain
NLRP	NLR family pyrin domain containing
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain
PA	Phlegmonöse Appendizitis
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PMN	Polymorphonuclear neutrophil
Pol-III	RNA Polymerase III
PRR	Pattern-recognition Rezeptoren
RIN	RNA Integrity Number
SOCS	suppressor of cytokine signaling
Th	T-Helferzellen
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tpl2	Tumor progression locus 2
TRAF	tumor necrosis factor receptor-associated factors
Treg	Regulatorische T-Zellen

## 2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Histologie der Appendix vermiformis .....	13
Abbildung 2 Arbeitsflussdiagramm. ....	28
Abbildung 3 Schematische Darstellung der Isolierung von PBMCs .....	29
Abbildung 4 Übersicht der eingeschlossenen Patient*innen .....	35
Abbildung 5 Qualitätskontrolle durch Bioanalyser .....	38
Abbildung 6 Boxplot.....	39
Abbildung 7 Histogramm mit statistischer Verteilung der für die einzelnen Gene berechneten p-Werte bei phlegmonöser vs. gangränöser Appendizitis. ....	40
Abbildung 8 Heatmap der Top 100 differentiell exprimierten Gene.....	41
Abbildung 9 Heatmap - Darstellung der immunologisch relevanten Gene basierend auf den p-Werten .....	42
Abbildung 10 Schematische Darstellung der hochregulierten Gene und dazugehörigen Proteine bei untersuchten Patient*innen mit phlegmonöser Appendizitis. ....	56
Abbildung 11 Schematische Darstellung der hochregulierten Gene und dazugehörigen Proteine bei untersuchten Patient*innen mit gangränöser Appendizitis .....	62

## 3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Beschreibung der klassischen klinischen Untersuchungsbefunde bei akuter Appendizitis.....	16
Tabelle 2 Alvarado-Score und Pediatric Appendicitis Score (PAS).....	20
Tabelle 3 Zusammenfassung der Ein- und Ausschlusskriterien. ....	26
Tabelle 4 Patientencharakterisierung .....	36
Tabelle 5 Laborwerte bei Patient*innen mit akuter Appendizitis.....	37
Tabelle 6 Zusammenfassung der Gene, die für Proteine des TCR-Komplexes kodieren und in der Gruppe der phlegmonösen Appendizitis signifikant höher exprimiert sind ( $p < 0,05$ ) .....	43
Tabelle 7 Zusammenfassung der in der Gruppe der phlegmonösen Appendizitis signifikant hochregulierten Gene ( $p < 0,05$ ).....	44
Tabelle 8 Zusammenfassung der bei gangränöser Appendizitis signifikant hochregulierten, immunologisch relevanten Gene ( $p < 0,05$ ).....	46
Tabelle 9 Signifikant unterschiedlich exprimierte Gene mit unspezifischer Funktion. ....	47

## 4 Zusammenfassung

Die akute Appendizitis zählt zu den häufigsten chirurgischen Notfällen im Kindes- und Jugendalter. Histologisch können phlegmonöse (nicht nekrotisierende) und gangränöse (nekrotisierende) Appendizitis unterschieden werden. Die Appendektomie gilt als Therapie der Wahl, wobei die aktuelle Studienlage darauf hindeutet, dass nicht operative Strategien bei phlegmonöser Appendizitis effektive Behandlungsalternativen darstellen. Eine verlässliche prätherapeutische Differenzierung der Entitäten ist derzeit jedoch nicht möglich. Aus unterschiedlichen Studien geht hervor, dass beide Entitäten durch verschiedene klinische Verläufe und immunologische Prozesse gekennzeichnet sind. Somit ist das Interesse an einer zuverlässigen präoperativen Differenzierung, die eine prätherapeutische Patientenstratifizierung erlaubt, groß.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die pathophysiologischen Vorgänge beider Entitäten auf Genexpressionsebene zu analysieren. Basierend auf den jeweiligen Expressionsmustern sollten zudem, im Rahmen eines Proof-of-Concept-Ansatzes, die Grundlage für die zukünftige Entwicklung von Biomarkern für die verlässliche präoperative Diagnosestellung geschaffen werden.

Primär eingeschlossen wurden 33 Kinder und Jugendliche im Alter von 7-17 Jahren, die sich in der Kinderrettungsstelle der Charité – Universitätsmedizin Berlin mit akuter Appendizitis vorstellten. Präoperativ wurden mit Einverständnis der Patient\*innen sowie der Sorgeberechtigten Blutproben im Rahmen der routinemäßigen Blutentnahme entnommen und periphere mononukleäre Zellen isoliert. Mittels RNA-Microarray-Technologie wurde bei 29 Patient\*innen eine genomweite Analyse der Genexpression mit Fokus auf immunologisch relevante Signalwege (Pathways) durchgeführt. Basierend auf der postoperativen histologischen Untersuchung erfolgte die Einteilung in phlegmonöse (n=13) und gangränöse (n=16) Appendizitis. Nach Quantilnormalisierung der Daten wurde die statistische Analyse mit dem Welch's Test durchgeführt, das Signifikanzniveau lag bei  $p < 0,05$ . Signifikante Unterschiede in der Expression fanden sich bei 3594 (6,3%) der insgesamt 56 666 untersuchten Gene.

Bei Patient\*innen mit phlegmonöser Appendizitis zeigte sich im Rahmen der immunologischen Pathway-Analyse eine Überexpression von CD40L, TRAF1, NIK, MHC-Klasse II, den B-Zell-Markern CD72 und CD79 sowie wesentlichen Bestandteilen des T-Zell-Rezeptor-Komplexes (TCR-Untereinheiten und CD3). Diese Überexpression im Vergleich zu Patient\*innen mit gangränöser Appendizitis spricht für eine B-/T-Zell

Interaktion, die auf eine virale Genese der phlegmonösen Appendizitis hinweist. Bei Patient\*innen mit gangränöser Appendizitis kam es hingegen zu vermehrter Aktivierung der IL-17, Toll-like- und NOD-like-Rezeptor Signalwege. CD11b, CD16b und CD64 als typische Marker für neutrophile Granulozyten und Komponenten des Komplementsystems waren ebenso höher exprimiert. Insgesamt deuten diese Expressionsmuster im Vergleich zu untersuchten Kindern und Jugendlichen mit phlegmonöser Appendizitis auf eine antibakterielle Immunantwort hin.

Diese grundlegenden Unterschiede in der Genexpression immunologisch relevanter Signalwege auf mRNA-Ebene festigen die These, dass phlegmonöser und gangränöser Appendizitis verschiedene pathophysiologische Mechanismen zugrunde liegen. Zudem bieten diese Ergebnisse die Grundlage für zukünftige Untersuchungen zur präoperativen Differenzierung der Entitäten auf immunologisch-molekularer Ebene.

## Abstract

Acute appendicitis is one of the most common surgical emergencies in children and adolescents. Histologically, phlegmonous (non-necrotizing) and gangrenous (necrotizing) appendicitis can be differentiated. Although appendectomy remains the treatment of choice, current studies suggest that non-surgical strategies for phlegmonous appendicitis are effective treatment alternatives. The reliable pretherapeutic differentiation of the entities is currently not possible. Depending on the pathological findings, the types of inflammation are marked by a distinct clinical course and different immunological processes. Therefore, there is a great interest in establishing a safe preoperative distinction for patient stratification.

Aims of this study were to display the pathophysiological differences of the different entities providing proof-of-concept on a gene expression level, along with finding hints for a reliable preoperative diagnosis through analyzing the associated gene-expression patterns.

33 patients aged 7-17 years diagnosed with acute appendicitis at the pediatric emergency department of Charité – Universitätsmedizin Berlin were included primarily. Blood samples were drawn during preoperative routine laboratory investigations after informed consent of the patients and their custodians. Peripheral blood mononuclear cells from 29 patients were isolated for genome-wide gene expression profiling using RNA-microarray technology, focusing on immunological pathways. Based on the postoperative histological findings, groups of phlegmonous (n=13) and gangrenous (n=16) appendicitis were established. After quantile normalization statistical analysis was performed using the Welch's t-test, level of significance was  $p < 0.05$ . 3594 (6.3%) of the 56 666 investigated genes showed significantly different gene expression.

Gene expression patterns in patients with phlegmonous appendicitis were characterized by an overexpression of CD40L, TRAF1, NIK, MHC-class II, B-cell markers CD72 and CD79 as well as components of the T-cell receptor complex (TCR-subunits and CD3). Compared to patients with gangrenous appendicitis, this overexpression indicates a B-/T-Zell interaction suggesting a viral genesis of phlegmonous appendicitis. On the other hand, an activation of the IL-17, toll-like and NOD-like receptor pathways was found in the group of gangrenous appendicitis. Furthermore, a higher expression of the neutrophil markers CD11b, CD16b and CD64 and components of the complement system was shown. In contrast to patients with phlegmonous appendicitis, these expression patterns display an antibacterial immune response.

These fundamental differences in the gene expression of immunological pathways on a mRNA level between the groups demonstrate additional evidence that phlegmonous and gangrenous appendicitis are based on different pathophysiological mechanisms. In addition, this data provides the foundation for forthcoming investigations concerning the preoperative differentiation of the entities on immunomolecular basis.

## 5 Einleitung

### 5.1 Geschichte

Die erste bekannte Zeichnung eines Wurmfortsatzes stammt von Leonardo da Vinci aus dem Jahr 1492. Er nannte ihn „oreccio“, zu Deutsch „kleines Ohr“ (McMurrich., 1931). Der Anatomieprofessor da Carpi beschrieb im Jahr 1521 die anatomische Struktur erstmalig als „Appendix vermiformis“ (Deaver, 1905). Wenig später präsentierte Vesalius 1543 eine Zeichnung der Appendix mit einem runden „Stein“ im Lumen des Wurmfortsatzes (Vesalius, 1543).

Die erste dokumentierte Appendektomie wurde 1735 von dem britischen Militärarzt Claudius Amyand durchgeführt. Er operierte einen 11-jährigen Jungen mit einer seit der Geburt bekannten, rechtsseitigen Leistenhernie. Intraoperativ stellte sich im Bruchsack eine entzündlich veränderte Appendix dar. Zudem konnte eine Perforationsstelle identifiziert werden. Es erfolgte eine unkomplizierte Appendektomie, der Patient erholte sich von der Operation und konnte einen Monat später aus dem Krankenhaus entlassen werden (Llullaku *et al.*, 2010). 1812 beschrieb John Parkinson einen Fall von einem 5-jährigen Jungen, der nur zwei Tage nach der initialen Vorstellung mit Erbrechen und Bauchschmerzen sowie Verschlechterung des Allgemeinzustandes an den Folgen einer perforierenden Appendizitis verstarb (Parkinson, 1812).

Die erste Appendektomie bei initialem Verdacht auf Appendizitis erfolgte 1880 durch Robert Lawson Tait in Edinburgh. Er operierte eine 17-jährige Patientin mit einem schwer entzündeten Wurmfortsatz. Sie erholte sich gut von der Operation (Skandalakis, Gray and Ricketts, 1994). Ohne Kenntnis davon führte der kanadische Arzt Abraham Groves 1883 eine Appendektomie an einem 12-jährigen Jungen mit rechtsseitigen Unterbauchschmerzen durch. Auch er erholte sich rasch von der Operation. 1886 veröffentlichte Reginald Fitz eine Arbeit, in der er die Appendizitis erstmalig histopathologisch als Ursache für ein inflammatorisches Krankheitsbild mit Schmerzen im rechten Unterbauch beschrieb. Zudem empfahl er die rasche operative Versorgung (Fitz Reginald H., 1886).

Charles McBurney präsentierte 1894 seine Operationstechnik mithilfe des nach ihm benannten Wechselschnittes (McBurney, 1894). Die konventionelle (offene)

Appendektomie war lange Zeit die einzige operative Alternative, bis 1980 Kurt Semm die erste laparoskopische Appendektomie an der Universität Kiel durchführte. Am Kind erfolgte die erste laparoskopische Appendektomie im Jahr 1992 durch Benno M. Ure an der Universität zu Köln.

### 5.2 Epidemiologie

Abdominelle Beschwerden zählen generell zu den am häufigsten genannten Symptomen in der Kinderrettungsstelle, wobei in 5-10% der Fälle akute Bauchschmerzen die Ursache für die Vorstellung darstellen (Balachandran, Singhi and Lal, 2013; Caperell, Pitetti and Cross, 2013). Bei der klinischen Diagnose eines akuten Abdomen bei Kindern über einem Jahr ist die akute Appendizitis die führende Ursache (Tseng *et al.*, 2008). Sie stellt mit einer Inzidenz von 100 pro 100 000 Einwohner/Jahr eine der häufigsten chirurgischen Notfälle dar (Sahm *et al.*, 2012). Der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem 10. und 19. Lebensjahr (Ohle *et al.*, 2011; Anderson *et al.*, 2012). In etwa 5% der Fälle sind Kinder im Alter von unter 6 Jahren betroffen (Alloo *et al.*, 2004).

Bei Mädchen findet sich eine erhöhte Rate an negativen Appendektomien. Als Ursache kommen diverse gynäkologische Differentialdiagnosen mit ähnlicher Klinik im Sinne einer pelvic inflammatory disease (PID) in Betracht. Unter dem Begriff der PID ist ein großes Spektrum akuter und subakuter Infektionserkrankungen der weiblichen Geschlechtsorgane zusammengefasst. Zudem fällt bei Patientinnen im Rahmen von Appendektomien eine höhere Rate an intraoperativen Komplikationen auf. Als mögliche Gründe hierfür werden die intraoperative Darstellung und die Untersuchung der inneren Geschlechtsorgane bei Mädchen und jungen Frauen diskutiert (Salö *et al.*, 2015).

Zudem scheinen jahreszeitliche Faktoren eine Rolle zu spielen. So konnte im Vergleich zu den Wintermonaten eine Häufung der Rate an Appendektomien in den Monaten Mai bis August festgestellt werden (Wolkomir *et al.*, 1987; Addiss *et al.*, 1990; Deng *et al.*, 2010; Rautava *et al.*, 2018). Die genaue Ursache hierfür ist nach wie vor unklar, diskutiert werden unter anderem vermehrte gastrointestinale Infekte sowie eine ballaststoffarme Ernährung in den Sommermonaten (Fares, 2014).

Die Kosten für die Behandlung der akuten Appendizitis im Kindesalter lassen sich für Deutschland nur näherungsweise beziffern. Im Jahr 2018 wurden in Deutschland 21 627

Kinder und Jugendliche im Alter von 0 bis 18 Jahren mit der Diagnose einer akuten Appendizitis behandelt (Statistisches Bundesamt (Destatis), 2020). In einer Untersuchung aus dem Jahr 2008 wurden die mittleren Kosten für die chirurgische Behandlung einer Appendizitis mit 3540 Euro pro Patient\*in berechnet. Auch wenn sich die mittleren Entgelte seit 2008 geändert haben, demonstriert die Berechnung, dass es sich bei der operativen Behandlung der akuten Appendizitis im Kindesalter um einen relevanten Kostenfaktor handelt.

### 5.3 Anatomie

Die Appendix vermiformis geht als Teil des Colons mit entsprechender Wandschichtung postero-medial aus dem Fundus des Caecums ab und befindet sich in ca. 65% der Fälle retrocaecal aufsteigend. Es sind jedoch mehrere Lagevarianten beschrieben: In ca. 31% der Fälle zieht die Appendix kaudal ins kleine Becken, seltener liegt sie transversal retrocaecal oder aufsteigend paracaecal. Caecum und Appendix werden dabei durch eine Schleimhautfalte, die so genannte Gerlach-Klappe (ostium appendicis vermiformis), voneinander getrennt. Die drei Tännien des Blinddarms (Taenia omentalis, Taenia libera und Taenia mesocolica) laufen an der Basis der Appendix zusammen und bilden eine geschlossene Längsmuskelschicht. Die arterielle Blutversorgung erfolgt über die Arteria (A.) appendicularis, einem Ast der A. ileocolica. Diese entspringt der A. mesenterica superior. Der venöse Abfluss erfolgt über die Vena (V.) appendicularis, welche über die V. ileocolica in die V. mesenterica superior abfließt. Innerviert wird die Appendix durch das sympathische und parasympathische Nervensystem über den Plexus mesentericus superior. Die sensible Innervation erfolgt über das Rückenmarksegment Th10 (Lippert, 2006).

Die Appendix galt lange Zeit als rudimentäres Organ, wobei in den vergangenen Jahren gezeigt werden konnte, dass sie eine wichtige immunologische Rolle einnimmt (Kooij *et al.*, 2016). Als Teil des darmassoziierten lymphatischen Gewebes (gut-associated lymphoid tissue, GALT) ist die Funktion des Blinddarmfortsatzes im Vergleich zu anderen lymphatischen Geweben im Darm besonders. Plausibel erscheint insbesondere die Hypothese, dass die Appendix eine Art „safe house“ für Darmbakterien darstellt. Gemäß dieser Annahme schützt der Wurmfortsatz die physiologische bakterielle Darmflora im Rahmen viraler gastrointestinaler Infektionen. Nach durchgemachter Infektion kann der

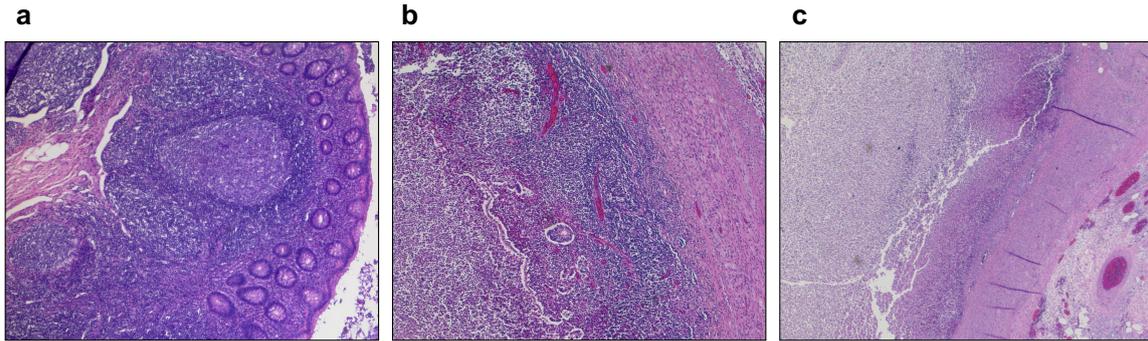
Darm wieder mit der Standortflora aus der Appendix besiedelt werden (Randal Bollinger *et al.*, 2007; Laurin, Everett and Parker, 2011).

#### 5.4 Pathophysiologie

Obwohl die akute Appendizitis eine hohe Inzidenz hat und zu den häufigsten chirurgischen Krankheitsbildern zählt, ist die genaue Pathogenese unbekannt. In der Vergangenheit wurde angenommen, die akute Appendizitis entstehe aufgrund einer intraluminalen Druckerhöhung bei Obstruktion des Wurmfortsatzes durch Koprolithen (Kotsteine), viskösen Stuhl oder - weitaus seltener - durch Fremdkörper, Parasiten oder lymphoide Hyperplasie. Die vermeintlich dadurch entstandene Ischämie mit Ulzeration führe letztlich zur bakteriellen Durchwanderung der Appendixwand (Prystowsky, Pugh and Nagle, 2005). In der Praxis ist die Obstruktion jedoch ein unzureichender ätiologischer Faktor, da nur bei einem Teil der Patient\*innen mit einer akuten Inflammation eine Obstruktion beobachtet werden kann (Carr, 2000; Bhangu *et al.*, 2015). Studien konnten zudem zeigen, dass Koprolithen in bis zu 27% aller Autopsien nachzuweisen sind. In keinem der Fälle konnte jedoch eine assoziierte Entzündung der Appendix festgestellt werden (Chang., 1981; Andreou, Blain and du Boulay, 1990).

##### 5.4.1 Pathologie

In der Arbeit von Norman Carr aus dem Jahr 2000 wurden histologische Kriterien einer phlegmonösen, gangränösen sowie perforierenden Appendizitis definiert. Die phlegmonöse Appendizitis ist durch eine Infiltration von neutrophilen Granulozyten der Lamina muscularis mucosae charakterisiert. Zu den möglichen Befunden gehören neben einer ödematösen Schwellung eine nicht-purulente Serositis, Mikroabszesse der Appendixwand oder Gefäßthromben. Der wesentliche Unterschied im Vergleich zur gangränösen Appendizitis ist das Fehlen einer Nekrose. Die gangränöse Appendizitis wird als vollständige Wandnekrose definiert und kann im weiteren Verlauf zu einem Wanddefekt, also einer Perforation führen (Carr, 2000).



**Abbildung 1** Histologie der Appendix vermiformis. a: normale Appendix mit Lymphfollikeln; b: phlegmonös veränderte Appendix mit diffuser Infiltration von Granulozyten; c: gangränös veränderte Appendix mit fast vollständiger Wandnekrose (modifiziert nach Kiss *et al.*, 2021).

#### 5.4.2 Komplizierte und unkomplizierte Appendizitis

Ursprünglich geprägt von dem klinischem Verlauf der Erkrankung wird im Rahmen einer Appendizitis häufig von einer komplizierten und unkomplizierten Erkrankung gesprochen, wobei ein komplizierter Verlauf auf postoperative Komplikationen wie Darmatonie, Peritonitis, Sepsis und Abszessbildung hindeutete (Graffeo and Counselman, 1996; St. Peter, Sharp, *et al.*, 2008). Im Rahmen aktualisierter Einordnungen wird die Appendizitis als kompliziert bezeichnet, sobald histopathologisch transmurale Nekrosen im Sinne einer gangränösen Appendizitis mit dem Risiko einer bakteriellen Migration und Kontamination der Bauchhöhle bis hin zur Perforation, nachzuweisen sind (Carr, 2000; Romano *et al.*, 2014; Imaoka *et al.*, 2016). In der vorliegenden Arbeit wird diese, aktuelle Einordnung verwendet.

#### 5.4.3 Immunologie der akuten Appendizitis

Die zellulären Bestandteile des Blutes stammen von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Die Entwicklung der jeweiligen Blutzellen erfolgt über mehrere Proliferationsschritte und wird im Wesentlichen durch Zytokine reguliert. Zunächst erfolgt die Differenzierung zur myeloischen oder lymphatischen Stammzelle. Zu der lymphatischen Zelllinie werden die B- und die T-Zellen sowie die NK-Zellen gezählt. Granulozyten, Monozyten, Thrombozyten sowie Erythrozyten stammen von einer myeloischen Stammzelle. Bei den Oberflächenmerkmalen von Zellen (Cluster of Differentiation, CD) handelt es sich um membrangebundene Glykoproteine, welche unterschiedliche Funktionen erfüllen. Sie sind zum Teil für eine bestimmte Zellpopulation

spezifisch und dienen somit als Zellmarker oder als Zielstruktur für pharmakologische Therapieansätze (Murphy and Weaver, 2018).

Patient\*innen, die im Kindes- oder Jugendalter appendektomiert wurden, erkrankten seltener an Colitis ulcerosa (Andersson and Lambe, 2001; Radford-Smith, 2002; Frisch, Pedersen and Andersson, 2009). In der Schwangerschaft, insbesondere im dritten Trimester, ist die Inzidenz der akuten Appendizitis im Vergleich zu einer Kontrollgruppe niedriger (Andersson and Lambe, 2001). In beiden Fällen kommt es zu einer Runterregulierung der durch Typ 2 T-Helferzellen (Th2-Zellen) vermittelten Immunantwort. Patient\*innen, die an einer perforierenden Appendizitis erkrankt waren, haben hingegen ein erhöhtes Risiko an Morbus Crohn zu erkranken (Frisch and Gridley, 2002; Kaplan *et al.*, 2007; Frisch, Pedersen and Andersson, 2009). Morbus Crohn ist durch eine Th1-vermittelte Immunantwort charakterisiert. Diese Erkenntnisse sprechen für immunologische Unterschiede bei den Arten der Erkrankung (Rubèr, 2012).

Wesentliche immunologische Untersuchungen zur Pathophysiologie der Appendizitis wurden durch die Arbeitsgruppe um Roland E. Andersson von der Universität Jönköping in Schweden durchgeführt, hierzu zählen insbesondere die Arbeiten von Marie Rubèr *et al.* So konnte bei Patient\*innen mit gangränöser Appendizitis zum einen eine erhöhte Sekretion von Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) im Vergleich zu Kindern mit phlegmonöser Appendizitis nachgewiesen werden, was auf eine Th1-vermittelte Immunreaktion hindeutet (Rubèr *et al.*, 2006). Zum anderen wurde eine erhöhte Freisetzung der proinflammatorischen Interleukine (IL) IL-17 und IL-6 gezeigt (Rubèr *et al.*, 2010). Bei Aktivierung von IL-6 kommt es zur vermehrten Differenzierung von Th17-Zellen und somit zur erhöhten Freisetzung von IL-17 (Bettelli, Oukka and Kuchroo, 2007). Die Rolle von IL-17 und IL-6 bei gangränöser Appendizitis wurde auch 2014 von Rivera-Chavez *et al.* beschrieben. Sie zeigten, dass ein Polymorphismus des IL-6 Gens unabhängig von der Symptombdauer die Wahrscheinlichkeit für das Entstehen einer gangränösen Appendizitis beeinflusst (Rivera-Chavez *et al.*, 2004). Somit wurden erstmalig immunologische Unterschiede bei Patient\*innen mit gangränöser und phlegmonöser Appendizitis aufgezeigt. Die transmurale Nekrose der Appendix ist somit wahrscheinlich nicht nur ein morphologisches Unterscheidungskriterium, sondern basiert auf einer unabhängigen inflammatorischen und insbesondere immunologischen Pathophysiologie. Eine besondere Relevanz erfahren diese immunologischen Unterschiede zwischen den

histopathologischen Entitäten durch die oben erläuterten Assoziationen mit unkomplizierten bzw. komplizierten klinischen Verläufen (siehe 5.4.2).

### 5.5 Diagnostik

Die akute Appendizitis im Kindes- und Jugendalter präsentiert sich häufig sehr vielfältig und kann daher die Diagnosestellung erschweren. Einige Symptome kommen im Rahmen einer Appendizitis zwar gehäuft vor, sind aber unspezifisch. Die Diagnosestellung erfolgt daher in Zusammenschau von anamnestischen Angaben, klinischer Untersuchung, Laborwerten sowie radiologischem Befund, wobei Letzterem eine besondere Bedeutung zukommt. Infolge aktueller Forschungserkenntnisse, die je nach Vorliegen von phlegmonöser oder gangränöser Appendizitis ein unterschiedliches therapeutisches Vorgehen nahelegen, soll im Rahmen der Diagnostik nicht nur eine Appendizitis erkannt, sondern zukünftig auch zwischen beiden Entitäten differenziert werden.

#### 5.5.1 Anamnese

Die Vorstellung in der Arztpraxis oder in der Notaufnahme erfolgt in aller Regel bei akuten Bauchschmerzen. Jugendliche beschreiben häufig eine Migration der Schmerzen, wobei die initialen Beschwerden am ehesten epigastrisch und periumbilikal beschrieben werden und erst im Verlauf in den rechten Unterbauch wandern. Subfebrile Temperaturen und Fieber gehören auch zu häufigen Symptomen und treten in der Regel 24-48 Stunden nach Symptombeginn auf. Übelkeit sowie Appetitlosigkeit zählen ebenso zum klassischen klinischen Bild einer Appendizitis, teilweise begleitet von Erbrechen. Verändertes Stuhlverhalten mit Durchfall oder Obstipation werden auch berichtet. Bei perforierender Appendizitis beschreiben die Patient\*innen zudem vereinzelt ein schmerzfreies Intervall gefolgt von einer erneuten Zunahme der Symptomatik (Rothrock and Pagane, 2000; Andersson, 2004).

#### 5.5.2 Klinische Untersuchung

In der klinischen Untersuchung zeigt sich klassischerweise eine Druckschmerzhaftigkeit im rechten unteren Quadranten (Druckschmerz über McBurney sowie Lanz-Punkt).

Zudem können ein kontralateraler Loslassschmerz sowie ein positives Psoas-Zeichen hinweisend für eine peritonitische Reizung im Rahmen einer Appendizitis sein. Ebenso wegweisend können Perkussions- und Erschütterungsschmerz sowie lokale Abwehrspannung im rechten Unterbauch sein (Bundy *et al.*, 2007; Rentea, Peter and Snyder, 2017). Die klassischen Appendizitiszeichen sind in Tabelle 1 beschrieben.

Kinder im Alter von 3-12 Jahren präsentieren in der klinischen Untersuchung häufig nur unspezifische Befunde. Die klassischen Appendizitiszeichen wie das Psoas- und Rovsing-Zeichen sind in dieser Altersgruppe in nur ca. 25% der Fälle positiv, wobei es bei etwa 80% der Kindern zu Schmerzen bei Hüpfen, Husten oder beim aufrechten Gehen kommt (Colvin, Bachur and Kharbanda, 2007).

**Tabelle 1** Beschreibung der klassischen klinischen Untersuchungsbefunde bei akuter Appendizitis (Snyder, Guthrie and Cagle, 2018).

Druckschmerz über McBurney-Punkt	Zwischen dem lateralen und mittleren Drittel der gedachten Linie zwischen der rechten Spina iliaca anterior superior und dem Bauchnabel
Druckschmerz über Lanz-Punkt	Zwischen dem rechten und mittleren Drittel der gedachten Linie zwischen den spinae iliaca anterior superior
Blumberg-Zeichen	Kontralateraler Loslassschmerz
Rovsing-Zeichen	Schmerzen bei dem rückwärtsgerichteten Ausstreichen des Colons Richtung Appendix
Psoas Dehnungsschmerz	Schmerzen bei aktiver Extension in der rechten Hüfte gegen Widerstand (a.e. bei retrocaecaler Lage der Appendix)

Die grundsätzlich unzureichende Sensitivität und Spezifität der Diagnosestellung einer akuten Appendizitis anhand der klinischen Untersuchung sowie die ausgeprägte „inter-observer reliability“ verdeutlicht die Herausforderung der klinischen Diagnostik bei Kindern mit Bauchschmerzen (Yen *et al.*, 2005; Bundy *et al.*, 2007; Kharbanda *et al.*, 2012; Benabbas *et al.*, 2017). Eine zudem wünschenswerte, bereits präoperative Unterscheidung zwischen gangränöser und phlegmonöser Appendizitis ist anhand des klinischen Bildes nicht möglich.

### 5.5.3 Labor

In bis zu 96% der Fälle besteht bei Patient\*innen mit akuter Appendizitis eine unspezifische Leukozytose und/oder eine Neutrophilie (Rothrock and Pagane, 2000). Kinder und Jugendliche mit einem unauffälligen Blutbild haben wiederum mit einer hohen Wahrscheinlichkeit keine Appendizitis und eine höhere Rate an sog. Negativappendektomien (Bates *et al.*, 2014). Häufig geht eine Appendizitis mit einem erhöhten CRP-Wert einher, allerdings ist die Spezifität und Sensitivität unzureichend (Andersson, 2004; Yu *et al.*, 2013).

Zur Vervollständigung der Diagnostik ist eine Urinanalyse zum Ausschluss einer (gegebenenfalls begleitenden) Harnwegsinfektion, bei jungen Frauen im gebärfähigen Alter ein Schwangerschaftstest zu empfehlen.

Zur prätherapeutischen Unterscheidung der histopathologischen Entitäten wurden in diversen Studien laborchemische Untersuchungen durchgeführt und verglichen. Bei gangränöser Erkrankung sind ein erhöhter CRP-Wert sowie höhere Leukozytenzahlen und eine Neutrophilie beschrieben (Yang *et al.*, 2019). Auch eine Hyperbilirubinämie wurde als potentieller Marker für das Vorhandensein einer Perforation diskutiert (Sand *et al.*, 2009). Die genannten Laborparameter zeigten letztlich keine ausreichende Sensitivität und Spezifität, um die Art der Appendizitis vorhersagen zu können (Muller *et al.*, 2015). Untersucht wurde auch das Verhältnis von verschiedenen Laborparametern zueinander. Hierzu zählen beispielsweise Forschungen zum Verhältnis von Neutrophilen zu Lymphozyten (Neutrophil to Lymphocyte Ratio) (Jung *et al.*, 2017; Hajibandeh *et al.*, 2020). In der Arbeit aus der eigenen Forschungsgruppe aus dem Jahr 2018 konnte bei Patient\*innen mit phlegmonöser Appendizitis laborchemisch eine relative Eosinophilie sowie Basophilie gezeigt werden (Minderjahn *et al.*, 2018). Diese Veränderungen sind im zeitlichen Verlauf konstant und deuten somit auf pathophysiologische Unterschiede hin. Dennoch sind Sensitivität und Spezifität unzureichend für eine sichere Differenzierung der Entitäten (Reismann, Schädlich, *et al.*, 2019). In dieser Hinsicht positiv zeigten sich Daten aus verschiedenen Arbeiten, die den Zusammenhang von Natriumspiegel im Serum und einer gangränösen Appendizitis untersucht haben. Ein systematisches Review hat gezeigt, dass diese Assoziation mit einer Sensitivität von >80%, jedoch sehr variabler Spezifität von 30-80% eine nur eingeschränkte Aussagekraft hat (Giannis, Matenoglou and Moris, 2020).

#### 5.5.4 Bildgebung

Gemäß der Leitlinie der Gesellschaft für Pädiatrische Radiologie ist bei Verdacht auf akute Appendizitis der abdominelle Ultraschall das bildgebende Verfahren der Wahl (Gesellschaft für Pädiatrische Radiologie 2020). Die Sonographie ist ein preisgünstiges und in der Regel gut verfügbares Verfahren zur weiterführenden Diagnostik. Insbesondere im Kindesalter wird diese Untersuchungsmethode gegenüber anderen bildgebenden Verfahren bevorzugt angewandt, da sie bei guter Aussagekraft ohne besonderen Aufwand durchführbar ist und es zu keiner Strahlenexposition kommt. Für eine Appendizitis typische Befunde sind ein Appendixdurchmesser von  $>6$  mm, eine Wandverdickung der Appendix von  $>2$  mm, freie intraabdominelle Flüssigkeit und eine Verdickung des Mesenteriums (Rawolle *et al.*, 2019). Bei unklarem Ultraschallbefund aufgrund mangelnder Compliance oder erschwerten Untersuchungsbedingungen bei Adipositas ist eine Magnetresonanztomographie (MRT) eine aussagekräftige Alternative (Gesellschaft für Pädiatrische Radiologie, 2020). Je nach Alter des Kindes ist für die Durchführung der MRT-Untersuchung eine Sedierung oder Narkose erforderlich, die wiederum risikobehaftet ist.

Mittels Computertomographie (CT) ist die Diagnosestellung einer akuten Appendizitis je nach Studie mit einer Sensitivität von 94-100% und Spezifität von 93-98% möglich (Platon *et al.*, 2009; Seo *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2012). Insbesondere Leitlinien und Studien aus dem anglo-amerikanischen Raum empfehlen bei Verdacht auf akute Appendizitis und einem unauffälligen bzw. nicht wegweisenden Ultraschallbefund auch im Kindesalter ein CT zur weiteren Diagnostik (Rothrock and Pagane, 2000; Smith and Fox, 2016). Europäische Gesellschaften und Leitlinien lehnen dieses Vorgehen ab und empfehlen das CT nur in Ausnahmefällen (Gesellschaft für Pädiatrische Radiologie, 2020). Grund hierfür ist die hohe Strahlenbelastung, mit der die CT-Untersuchung assoziiert ist. Bei zusätzlicher Applikation von Kontrastmittel kann es zudem zu einer allergischen Reaktion kommen. Dies kommt zwar insgesamt selten vor, sollte aber im Rahmen der Risikoabwägung mitberücksichtigt werden (Dillman, Trout and Davenport, 2018).

In einer aktuellen Untersuchung zum Wert der Sonographie für die Unterscheidung verschiedener Entitäten der Appendizitis konnte gezeigt werden, dass die Darstellung eines Konglomerattumors sowie die Aussage des Untersuchers, dass wahrscheinlich

eine Perforation vorliegt, hochspezifisch für das Vorliegen einer gangränösen Appendizitis ist – bei jedoch geringen Sensitivitäten. Auch ein vergrößerter Appendixdurchmesser, eine periappendizitische Umgebungsreaktion mit Imbibierung des Fettgewebes, freie Flüssigkeit und ein Abszess sind signifikant mit einer gangränösen Appendizitis assoziiert (Rawolle *et al.*, 2019). Allerdings ist als Limitation des Ultraschalls zu erwähnen, dass die Qualität stark von der Compliance des Kindes und der Erfahrung des Untersuchers abhängig ist. Die Differenzierung der Entitäten der Appendizitis kann ebenso mittels CT oder MRT gestellt werden (Kim *et al.*, 2014; Rosenbaum *et al.*, 2017). Diese bildgebenden Verfahren haben trotz einer hohen Spezifität von 85-99% insbesondere bei pädiatrischen Patient\*innen die bereits zuvor beschriebenen Limitationen.

### 5.5.5 Scores zur Diagnostik der akuten Appendizitis

Da die Diagnostik der akuten Appendizitis bei Kindern und Jugendlichen weiterhin erschwert ist, wurden verschiedene Scores zur höheren diagnostischen Sicherheit entwickelt und untersucht. Der Alvarado-Score beinhaltet acht prädiktive Faktoren, maximal kann eine Punktzahl von insgesamt zehn Punkten erreicht werden. Initial wurde er zur Anwendung an Erwachsenen entwickelt und erst im Verlauf an pädiatrischen Patient\*innen angewandt. Der Pediatric Appendicitis Score (PAS) hingegen wurde explizit für Kinder entwickelt, auch hier können maximal zehn Punkte erreicht werden. In Tabelle 2 sind der Alvarado-Score sowie der PAS mit den jeweiligen Parametern zusammengefasst. Die Spezifität dieser Scores wird in der Literatur mit 50 bis 100% angegeben, sodass die diagnostische Wertigkeit unklar ist. Derzeit kann davon ausgegangen werden, dass sie zumindest als diagnostische Hilfestellung dienen (Goldman *et al.*, 2008; Escribá *et al.*, 2011; Pogorelić *et al.*, 2015).

Die sichere Unterscheidung der phlegmonösen bzw. gangränösen Appendizitis ist naturgemäß letztlich erst mit der histopathologischen Untersuchung nach Appendektomie möglich. Anhand der klinischen, laborchemischen und radiologischen Befunde wurden verschiedene Scoring-Systeme zur Differenzierung dieser Entitäten untersucht (Williams *et al.*, 2009; Bröker *et al.*, 2012; Gorter *et al.*, 2016). Allerdings haben diese Modelle bei unzureichender Spezifität und Sensitivität keine Relevanz in der Klinik.

**Tabelle 2** Alvarado-Score und Pediatric Appendicitis Score (PAS).

Alvarado-Score		Pediatric Appendicitis Score	
Wanderschmerz	1	Wanderschmerz	1
Appetitlosigkeit	1	Appetitlosigkeit	1
Übelkeit/Erbrechen	1	Übelkeit/Erbrechen	1
Schmerzen im rechten Unterbauch	2	Schmerzen im rechten Unterbauch	2
Loslassschmerz	1	Schmerzen bei Husten, Erschütterung oder Perkussion	2
Erhöhte Körpertemperatur $\geq 37,3^{\circ} \text{C}$	1	Erhöhte Körpertemperatur $\geq 38,0^{\circ} \text{C}$	1
Leukozytose $\geq 10\ 000/\mu\text{l}$	2	Leukozytose $\geq 10\ 000/\mu\text{l}$	1
Linksverschiebung im Blutbild $\geq 75\%$	1	Linksverschiebung im Blutbild $\geq 75\%$	1

### 5.5.6 Methoden des maschinellen Lernens und der künstlichen Intelligenz

Eine weitere, untersucherunabhängige Methode zur Diagnostik der akuten Appendizitis stellt die Verwendung von künstlicher Intelligenz dar. Anhand verschiedener Ansätze konnte durch Erfassung von Alter und Laborwerten der Patient\*innen die Diagnose einer akuten Appendizitis mit einem positiven Vorhersagewert von  $>90\%$  gestellt werden (Akmese *et al.*, 2020; Aydin *et al.*, 2020). Unter Verwendung von Differentialblutbild, CRP und sonographischem Befund konnte mittels Biomarker-Signaturen eine Sensitivität von  $93\%$  und eine Spezifität von  $67\%$  erreicht werden. Ebenso wurde die Differenzierung der beiden Entitäten untersucht, wobei hier der sonographisch gemessene Appendixdurchmesser für das Modell nicht erforderlich war und lediglich auf Laborwerten basiert. Das Vorhandensein einer Gangrän konnte mit einer Sensitivität von  $95\%$  vorhergesagt werden. Die Spezifität lag jedoch bei nur  $33\%$  (Reismann, Romualdi, *et al.*, 2019).

## 5.6 Therapie

### 5.6.1 Aktuelle Therapiestrategien

#### 5.6.1.1 Appendektomie

Bei akuter Appendizitis ist aktuell die Appendektomie Therapie der Wahl (Hall *et al.*, 2017). Diese kann laparoskopisch oder offen-chirurgisch erfolgen. Aufgrund der geringeren Anzahl an Wundinfektionen und des kürzeren Krankenhausaufenthaltes wird das laparoskopische Vorgehen bevorzugt (Jaschinski *et al.*, 2018). Lange Zeit wurde angenommen, dass bei Diagnosestellung notfallmäßig operiert werden muss, um eine mögliche Perforation und somit eine erhöhte Rate an perioperativen Komplikationen zu verhindern. Diese Annahme wurde jedoch widerlegt indem gezeigt werden konnte, dass eine Verzögerung der Operation von bis zu 24 Stunden nach initialer Vorstellung nicht mit vermehrten Komplikationen assoziiert ist: Das Risiko für eine Re-Operation oder eine Wundinfektion ist nicht erhöht (Yardeni *et al.*, 2004; Almström *et al.*, 2017). Die Rate einer Perforation und einer intraabdominellen Abszessbildung zeigt sich unverändert (Bhangu *et al.*, 2015). Basierend auf diesen Studienergebnissen operieren viele (kinder-) chirurgische Abteilungen Patient\*innen, die sich am späten Abend oder nachts mit akuter Appendizitis vorstellen, nicht notfallmäßig in der Nacht, sondern geplant zeitnah am Folgetag.

Auf der Basis von gangränisierenden und insbesondere von (gedeckt) perforierenden Appendizitiden kann es perityphlitisch und in anderen intraabdominalen Regionen zur Ausbildung von Abszessen kommen. In diesem Fall wird aktuell eine primär konservative antibiotische Therapie empfohlen, zudem kann insbesondere abhängig von der Abszessgröße die CT-gestützte oder sonographisch kontrollierte Anlage einer Drainage in Betracht gezogen werden. Nach der Akutphase ist eine Appendektomie im Intervall (in ca. 6-10 Wochen) zu diskutieren (Weber *et al.*, 2003; Nadler *et al.*, 2004; Andersson and Petzold, 2007; Simillis *et al.*, 2010).

#### 5.6.1.2 Antibiotische Therapie

Bei der Diagnosestellung, spätestens aber 30 bis 60 Minuten vor Operationsbeginn wird der Beginn einer antibiotischen Therapie empfohlen (Litz *et al.*, 2018). Der im

Appendixabstrich am häufigsten nachgewiesene Erreger ist *Escherichia coli* (*E. coli*), gefolgt von *Pseudomonas aeruginosa* und *Klebsiella pneumoniae* (Song *et al.*, 2018). Zwar ist *E. coli* gegen die gängigen Antibiotika (z.B.: Amoxicillin/Clavulansäure und Ciprofloxacin) sensibel, gibt es bei Pseudomonaden und Klebsiellen häufig Resistenzen. Zu den empfohlenen Therapieoptionen zählen daher Piperacillin/Tazobactam, eine Kombination von Cefuroxim und Metronidazol oder Cefotaxim und Metronidazol (Maltezou *et al.*, 2001; St. Peter, Tsao, *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010; Fallon *et al.*, 2015). Hierbei muss allerdings die grundsätzlich fehlende Wirksamkeit von Cephalosporinen gegen Enterokokken („Enterokokkenlücke“) beachtet werden. Im Rahmen einer phlegmonösen Appendizitis führt die einmalige Gabe eines Antibiotikums präoperativ nicht zu einer erhöhten Rate von Wundinfektionen und verkürzt sogar die Aufenthaltsdauer im Krankenhaus (Rentea, Peter and Snyder, 2017). Bei gangränöser Appendizitis wird das Fortführen der Therapie für 3-5 Tage empfohlen (van Rossem *et al.*, 2014).

### 5.6.2 Konservative Therapiestrategien

In den letzten Jahren wurden einige randomisiert kontrollierte Studien durchgeführt, die konservative und operative Behandlungsstrategien bei Patient\*innen mit nicht perforierender Appendizitis verglichen. In bis zu 75% der Fälle konnten entsprechende Patient\*innen ohne Operation behandelt werden (Styrud *et al.*, 2006; Varadhan, Neal and Lobo, 2012). Konservative Therapiestrategien wurden somit erstmalig als eine mögliche Alternative zur operativen Versorgung der Appendizitis gesehen. Infolge dieser Erkenntnisse bei Erwachsenen wurden mehrere klinische Studien an Kindern und Jugendlichen mit akuter Appendizitis durchgeführt. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine nicht-operative Therapie bei Patient\*innen mit nicht perforierender Erkrankung möglich ist (Svensson *et al.*, 2015; Hartwich *et al.*, 2016; Hall and Eaton, 2018).

Während in den oben genannten Studien die operative der antibiotischen Therapie gegenübergestellt wurde, gehen Andersson *et al.* davon aus, dass die histopathologisch phlegmonöse Appendizitis mit einer hohen Spontanheilungsrate einhergeht, womit sich jegliche Therapie dieser Art der Inflammation erübrigen würde (Andersson, 2007). Dieser These folgend wurde in der prospektiv randomisierten Studie von Park *et al.* die rein

supportive mit einer antibiotischen Therapie (in diesem Fall intravenöse Applikation von Cefmetazol und Metronidazol) bei Patient\*innen mit unkomplizierter Appendizitis verglichen. Zwölf Monate nach Einschluss der Patient\*innen konnte in den untersuchten Gruppen bezüglich des Therapieerfolges kein signifikanter Unterschied gezeigt werden (Park, Kim and Lee, 2017).

## 5.7 Genexpressionsanalyse in der klinischen Forschung

Die genomweite Genexpressionsanalyse mittels Microarray-Technologie wird in der Onkologie bereits seit einigen Jahren erfolgreich in der Tumordiagnostik und Therapie verwendet (Quackenbush, 2006). Dies hat zur Folge, dass diese Technik auch zunehmend in anderen Bereichen der Medizin angewandt wird, um die Pathophysiologie komplexer Krankheitsbilder besser zu verstehen und spezifische Biomarker zur Diagnostik zu identifizieren.

Bei der RNA-Microarray-Technik wird die Expression eines zentralen Moleküls der Proteinbiosynthese untersucht: der mRNA (Boten-Ribonukleinsäure, engl. messenger ribonucleic acid). Im Rahmen der physiologischen Vorgänge erfolgt die sog. Transkription von DNA (Desoxyribonukleinsäure, engl. desoxyribonucleic acid) mittels DNA-abhängigen RNA-Polymerasen zu einzelsträngiger RNA (Löffler, 2008b). Im Anschluss erfolgt die Translation der Information in sogenannte Polypeptide durch Bindung der mRNA am Ribosom: Ein aus drei Basen bestehendes Codon kodiert für eine proteinogene Aminosäure, somit entsteht eine Aminosäurekette. Erst nach deren Faltung entsteht ein funktionsfähiges Protein (Löffler, 2008a). Je nach aktueller Aktivität der Zelle werden nur spezifische Proteine und dementsprechend bestimmte mRNA Sequenzen benötigt. Somit wird durch Analyse der mRNA ein zentraler Teil der Proteinbiosynthese mit sehr guter zeitlicher Auflösung untersucht.

Tang *et al.* konnten bei erwachsenen Patient\*innen fünfzig Gene identifizieren, die im Rahmen einer Sepsis im Vergleich zu kritisch kranken Patient\*innen ohne Nachweis einer Sepsis signifikant unterschiedlich exprimiert waren. Anhand der identifizierten Gene erfolgte unter Verwendung von künstlicher Intelligenz die Identifizierung einer Biomarker-Signatur. Das Vorhersagemodell konnte in 44 von 50 Fällen eine Sepsis identifizieren und erreichte eine Vorhersagegenauigkeit von 88% (Tang *et al.*, 2007).

Auch bei pädiatrischen Patient\*innen wurde die Genexpression im Rahmen von septischen Krankheitsbildern untersucht (Wong *et al.*, 2009; Cornell *et al.*, 2010; Balamuth *et al.*, 2020). Balamuth *et al.* haben mit ihrer Studie die Durchführbarkeit einer Genexpressionsuntersuchung bei Kindern mit Sepsis in der akuten Versorgungssituation in einer Kinderrettungsstelle bewiesen.

In der Literatur beschrieben sind einige genomweite Genexpressionsuntersuchungen bei akuter Appendizitis (Murphy *et al.*, 2008; Chawla *et al.*, 2016). Allerdings wurde die akute Appendizitis in den betreffenden Untersuchungen unabhängig von der Histopathologie als ein homogenes Krankheitsbild betrachtet, sodass ein Vergleich der Studienergebnisse mit der hier vorgestellten differenzierten Untersuchung nicht möglich ist.

## 6 Hypothese und Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit basiert auf der Annahme, dass es sich bei histopathologisch phlegmonöser und gangränöser Appendizitis um unterschiedliche Erkrankungen handelt und nicht – wie lange angenommen – die phlegmonöse Inflammation unbehandelt zu einem Gangrän und schließlich einer Perforation führt (Andersson, 2007). Die Arten der Entzündung gehen entsprechend mit spezifischen klinischen Verläufen (unkompliziert und kompliziert) einher. Die zuverlässige prätherapeutische Unterscheidung von histopathologisch phlegmonöser und gangränöser Appendizitis ist insbesondere für die sichere Etablierung konservativer Behandlungsstrategien essenziell. Aktuelle Forschungsergebnisse sprechen für unterschiedliche immunologische Prozesse bei der Entstehung der phlegmonösen und gangränösen Appendizitis (Rubè *et al.*, 2006, 2010). Es ist davon auszugehen, dass sich diese Prozesse auf molekularer bzw. Proteinebene und somit auf Genexpressionsebene widerspiegeln und folglich zu detektieren sind.

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit lautet, dass die histopathologisch phlegmonöse und die gangränöse Appendizitis im Kindes- und Jugendalter durch jeweils verschiedene immunologische Genexpressionsmuster charakterisiert sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit war zum einen, Unterschiede zwischen phlegmonöser und gangränöser Appendizitis auf Genexpressionsebene und mittels anschließender immunologischer Pathway-Analyse zu untersuchen, um neue Erkenntnisse in der Pathophysiologie dieser Erkrankungen zu gewinnen. Zum anderen sollten auf der Basis der verschiedenen immunologischen Vorgänge grundlegende Erkenntnisse für die Entwicklung differenzierender Marker beschrieben werden.

## 7 Methodik

Die Durchführung dieser single-center prospektiven Studie wurde von der zuständigen Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin genehmigt. Die Genehmigung wurde für insgesamt 30 Kinder und Jugendliche im Alter von 7-17 Jahren zuzüglich einer angenommenen Ausschlussrate von 10% (3 Patienten) erteilt. Die Referenznummer lautet ES2/130/16. Das Projekt wurde über Drittmittel der Kronprinzessin Lovisas förening för barnsjukvård (Stockholm, Schweden) finanziell gefördert und war mit der Laufzeit vom 01.08.2018 bis 31.07.2020 bei der Drittmittelverwaltung der Charité – Universitätsmedizin Berlin unter der Kennung 89834613 gemeldet.

Eingeschlossen wurden Kinder und Jugendliche, die sich in der Notaufnahme der Kinderklinik der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum vorstellten und bei denen aufgrund der sonographischen Verdachtsdiagnose einer akuten Appendizitis die Indikation zur Appendektomie gestellt wurde. Sowohl die Sorgeberechtigten als auch die Patient\*innen wurden anhand von altersgerechten Aufklärungsbögen (Alter von 7-14 und 15-17 Jahren) über das Prozedere informiert. Das Einverständnis mit Unterzeichnung eines entsprechenden Formulars wurde eingeholt. Eine Übersicht der Ein- und Ausschlusskriterien findet sich in Tabelle 3.

**Tabelle 3** Zusammenfassung der Ein- und Ausschlusskriterien.

<b>Einschlusskriterien</b>	<b>Ausschlusskriterien</b>
Sonographischer Verdacht auf akute Appendizitis	Antibiotische Therapie in den vergangenen 2 Wochen
Alter 7-17 Jahre	Chronische Erkrankungen
Appendektomie nach Diagnosestellung	Zeit zwischen Blutentnahme und Weiterverarbeitung der Proben >1h
Schriftliches Einverständnis	Unzureichende mRNA Qualität

### 7.1 Epidemiologie

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden epidemiologische Daten der eingeschlossenen Kinder und Jugendlichen digital durch das Patientendokumentationssystem SAP für Windows, Version 6.5 (SAP SE, Walldorf, Deutschland) erfasst. Diese Parameter

beinhalten Alter, Geschlecht sowie Vor- oder Begleiterkrankungen der Patient\*innen. Zudem wurde der Zeitraum vom anamnestischen Beginn der Symptome (+/- 30 min) bis zum digital dokumentierten Zeitpunkt der Blutentnahme berechnet, um die Vergleichbarkeit des zeitlichen Verlaufes sicherzustellen.

## 7.2 Labor

Es erfolgte die Analyse der im Rahmen der Routinediagnostik untersuchten Laborwerte. Hierzu zählen die Bestimmung von CRP (mg/dl) und Differentialblutbild (Zellen/nl).

## 7.3 Pathologische Untersuchung

Das Appendektomiepräparat jedes Kindes, das an der Charité - Universitätsmedizin Berlin bei akuter Appendizitis operiert wird, wird standardmäßig mit Formalin fixiert und pathologisch untersucht.

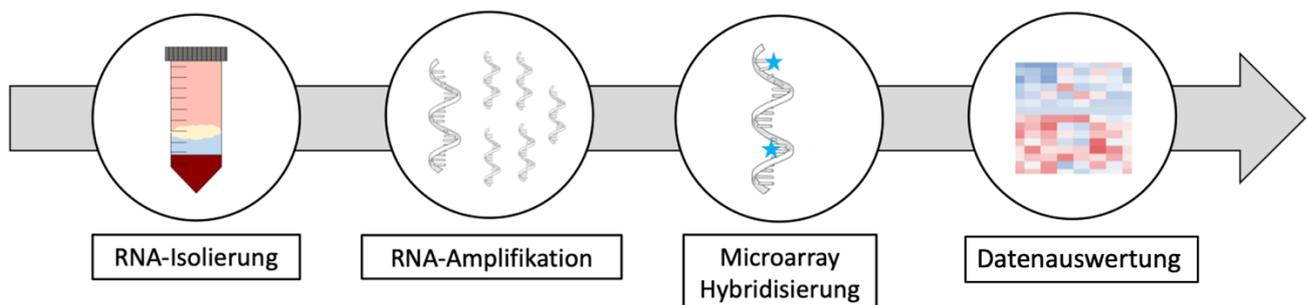
Zur Qualitätskontrolle werden alle im Institut für Pathologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin untersuchten Präparate von mindestens zwei Pathologen beurteilt. Die primäre Untersuchung erfolgt in der Regel durch eine\*n Ärztin\*Arzt in Weiterbildung, die dann durch eine\*n Oberärztin\*arzt validiert wird. Der diagnostische Standard des Institutes für Pathologie wird zudem durch klinisch-pathologische Konferenzen gesichert (Horst, 2021). Da die exakte Differenzierung der Entitäten eine wichtige Grundlage für diese Forschungsarbeit ist, wurden die Proben der eingeschlossenen Patient\*innen zur Sicherstellung der histopathologischen Diagnose von einer Paidopathologin untersucht und insbesondere hinsichtlich der Festlegung *phlegmonös* oder *gangränös* erneut befundet. Bei einer Diskrepanz zwischen den Untersuchungsbefunden erfolgte die Einteilung anhand der Begutachtung der Kinderpathologin. Die Klassifikation in phlegmonöse und gangränöse Appendizitis erfolgte anhand der histologischen Kriterien nach Carr, siehe Abbildung 1 (Carr, 2000).

## 7.4 Genexpressionsanalyse

Die Genexpressionsanalyse sowie die Analyse der Daten erfolgte in Kooperation mit der OakLabs GmbH (Neuendorfstr. 16 B, 6761 Hennigsdorf. Registernummer HRB 9545 NP, Amtsgericht Neuruppin).

Die Blutentnahme für die erforderliche Zellisolierung und die Genexpressionsanalyse erfolgte dem Ethikvotum entsprechend im Rahmen der Routinelabor Diagnostik bei Verdacht auf akute Appendizitis (Differentialblutbild und CRP). Eine zusätzliche Venenpunktion für die Entnahme der Proben konnte somit vermieden werden.

Es erfolgte die Isolierung der RNA aus peripheren mononukleären Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMC). Hierfür wurde den Patient\*innen 5 ml Blut (zwei VACUETTE® RÖHRCHEN 2,5 ml LH Lithium Heparin Separator, Greiner Bio-One, Leipzig) zur Weiterbearbeitung entnommen. Die Proben wurden innerhalb von maximal einer Stunde nach der Gewinnung weiterverarbeitet. Abbildung 2 zeigt eine Übersicht zu den einzelnen Schritten von der RNA-Isolierung bis zur statistischen Analyse der Microarray-Daten.



**Abbildung 2** Arbeitsflussdiagramm.

### 7.4.1 Dichtegradientenzentrifugation

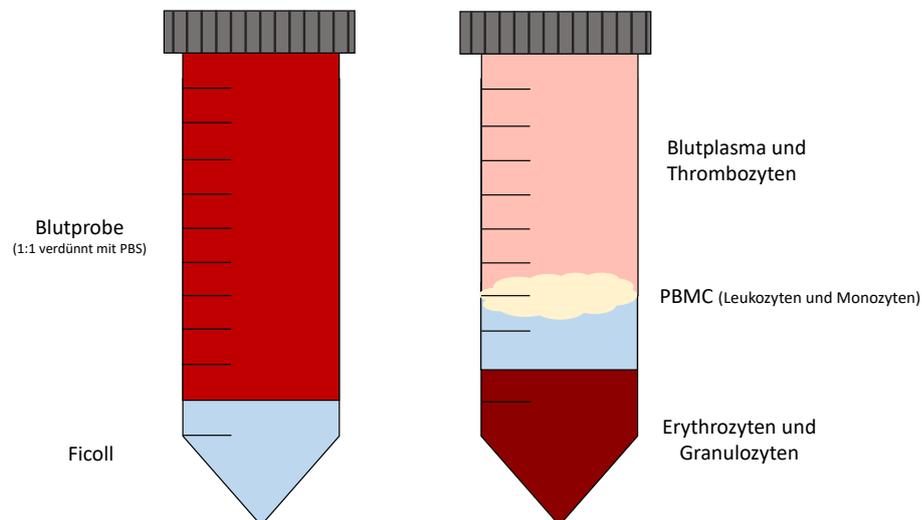
Das Blut wurde im Verhältnis von 1:1 mit phosphatgepufferter Salzlösung (phosphate-buffered saline, PBS) verdünnt. Im Anschluss wurde die Lösung langsam auf 2 ml Ficoll PM400 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA) geschichtet und bei Raumtemperatur für 30 Minuten bei 400g ohne zugeschaltete Bremse zentrifugiert. Die Dichte des Ficoll (1,2 g/ml) ist größer als die der Lymphozyten und Monozyten und geringer als die der Erythrozyten und dem Großteil der Granulozyten.

Durch die Zentrifugation entstehen vier Phasen:

1. eine obere Schicht bestehend aus Blutplasma sowie Thrombozyten
2. ein weißlicher Zellring bestehend aus Leukozyten und Monozyten
3. das Trennmedium
4. eine unterste Schicht aus Erythrozyten und den restlichen Granulozyten.

Der Zellring wurde isoliert, in PBS aufgeschwemmt und bei Raumtemperatur jeweils für 5 Minuten bei 400g mit Bremse zentrifugiert.

Der Überstand, bestehend aus Blutplasma und Thrombozyten, wurde vorsichtig abgesaugt, das entstandene Pellet (heller Zellring in Abbildung 3) in 12 ml PBS aufgeschwemmt. Nach einem weiteren Waschvorgang wurde das entstandene Pellet in 1 ml PBS aufgeschwemmt. Nach Überführung in ein Gefrierrohrchen und abschließender Zentrifugation mittels Mikrozentrifuge wurde der Überstand abgesaugt. Die nativen Zellen wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in einem Probehälter Nalgene® Mr. Frosty® (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) eingefroren. Im Anschluss wurden die Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in Flüssigstickstoff gelagert.



**Abbildung 3** Schematische Darstellung der Isolation von PBMCs. Links vor der Zentrifugation, rechts danach. Der Zellring (Pellet) bestehend aus Leukozyten und Monozyten wird im Anschluss isoliert und weiterverarbeitet.

#### 7.4.2 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA erfolgte mittels TRIzol® Reagenz (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Die zuvor hergestellten PBMCs wurden mit dem genannten Reagenz homogenisiert, im Anschluss wurde Chloroform hinzugefügt. Das dabei entstehende Homogenat trennt sich grundsätzlich in drei Schichten. Die obere Schicht ist wässrig und beinhaltet die RNA. Die untere, organische Schicht beinhaltet die DNA und Proteine, dazwischen befindet sich eine Grenzschicht. Zur Konzentrierung der RNA erfolgte die Fällung mittels Isopropanolol.

#### 7.4.3 Qualitätskontrolle und Quantifizierung der RNA

Die Qualität der isolierten RNA wurde mit Hilfe eines Bioanalyzers (Bioanalyzer 2100™, Agilent Technologies, Waldbronn) unter Verwendung des RNA 6000 Pico Kit untersucht. Der RNA Integritätswert (RIN, RNA Integrity Number) ist der von Bioanalyzer verwendete Algorithmus, welcher die Qualität der RNA beschreibt. Dafür wurden neben anderen Charakteristika insbesondere die 18S und 28S Sequenzen untersucht. Die RIN kann Werte von 1 bis 10 erreichen, wobei 10 der Bestwert ist. Zudem erfolgte vor Normalisierung der Daten die Erstellung eines Bloxplot, um die Signalverteilung der einzelnen Proben zu visualisieren und somit miteinander vergleichen zu können.

Zusätzlich wurde der NanoDrop™ 2000 Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) zur Quantifizierung und Beurteilung der Reinheit der RNA verwendet. Die Spektralphotometrie basiert auf den physikalischen Grundlagen des Lambert-Beer'schen Gesetzes. Es beschreibt die direkte Korrelation zwischen der Absorption und der Konzentration eines bestimmten Mediums. Nukleinsäuren absorbieren Licht unterschiedlicher Wellenlängen, der Peak liegt bei 260 nm (UV-Licht). Dies wird genutzt, um die RNA-Probe zu quantifizieren. Um die Reinheit der Probe zu prüfen, wird das Verhältnis  $A_{260}/A_{280}$  (Zielwert 2,1-1,8) und  $A_{260}/A_{230}$  (Zielwert >1,8) bestimmt. Proteine absorbieren Licht bei einer Wellenlänge von 280 nm, Phenole und chaotrope Verbindungen bei 230 nm. Somit können auch mögliche Verunreinigungen detektiert werden. Nachdem die Qualität der Proben durch die oben genannten Kriterien gesichert worden war, wurde die gewonnene RNA weiterverarbeitet.

#### 7.4.4 Microarray Technik

Für die genomweite Genexpressionsanalyse wurden Microarrays von OakLabs, Hennigsdorf und Agilent Technologies, Waldbronn verwendet. Mit Hilfe des Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies, Waldbronn) wurde fluoreszierende cRNA (complementary RNA) generiert. Die Hybridisierung erfolgte mit dem Gene Expression HybridizationKit (Agilent Technologies, Waldbronn). Jeweils 600 ng cRNA wurde bei 65°C für 17 Stunden auf einem 8x60K Microarray im „Hybridization chamber and oven“ hybridisiert (Agilent Technologies, Waldbronn). Im Anschluss wurden die Arrays für jeweils eine Minute bei Raumtemperatur (Agilent Gene Expression Wash Buffer 1) und bei 37°C (Agilent Gene Expression Wash Buffer 2) gewaschen. Die hybridisierten Microarrays wurden mit dem SureScan Microarray Scanner (Agilent Technologies, Waldbronn) gescannt, eine 20 bit TIFF Datei wurde generiert. Um diese zu lesen, wurde die Agilent Feature Extraction Software 11.0 (Agilent Technologies, Waldbronn) genutzt.

#### 7.5 Analyse der epidemiologischen und laborchemischen Daten

In einer Boxplot-Analyse der kontinuierlichen Variablen unter den epidemiologischen, zeitlichen und routinemäßig untersuchten laborchemischen Parametern fanden sich jeweils asymmetrische Verteilungen, sodass von nicht normalverteilten Daten ausgegangen wurde. Die statistische Analyse erfolgte für kontinuierliche Variablen mittels Mann-Whitney-U-Test und für kategoriale Variablen mittels Chi-Quadrat-Test. Die Analyse wurde mit der GraphPad Prism software (Version 9.1.0, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

#### 7.6 Analyse der Genexpressionsdaten

##### 7.6.1 Quantilnormalisierung

Die Normalisierung der Daten erfolgte durch die quantile Normalisierung nach Bolstad *et al.* (Bolstad *et al.*, 2003). Diese basiert auf der Annahme, dass die Signalverteilung aller Arrays gleich verteilt sind. Im Vergleich zu der so genannten Medianzentrierung sollen hierbei nicht nur der Median (50% Quantil) aller Arrays annähernd gleich sein, sondern sämtliche Quantile. Die normalisierten Daten können somit verglichen werden. Die

statistische Analyse (phlegmonöse vs. gangränöse Appendizitis) erfolgte mittels Welch's Test. P-Werte  $<0,05$  wurden als statistisch signifikant beurteilt.

### 7.6.2 Hierarchische Clusteranalyse

Bei der hierarchischen Clusteranalyse stellt zu Beginn jedes Objekt ein Cluster dar. In den folgenden Schritten fusionieren die Cluster mit der jeweils geringsten Distanz zueinander, bis alle Objekte einem übergeordneten Objekt zugehörig sind. Diese Clusteranalyse wird mithilfe eines so genannten Dendrogramms (griechisch dendron = Baum) dargestellt. Die Distanz oder Unähnlichkeit der zusammengeführten Cluster wird dargestellt, indem die Länge der Verbindungslinie die Ähnlichkeit der Gruppen widerspiegelt. Somit werden sowohl Proben als auch einzelne Gene mit ähnlichen Expressionsprofilen als zusammengehörig erkannt und bilden Cluster. Proben mit sehr unterschiedlicher Genexpression können differenziert werden.

### 7.6.3 Heatmap

Zur Visualisierung der Genexpressionsdaten wurden Heatmaps erstellt. Dieses Verfahren dient zur Analyse von Microarray-Daten, indem die gemessenen Expressionswerte in Form einer Matrix dargestellt werden. In den Zeilen sind die jeweiligen Gene dargestellt, die über die Spalten den entsprechenden Proben zugeordnet werden. Die Proben werden zueinander in ein Verhältnis gestellt, wobei die Ähnlichkeit der Transkriptionsprofile visualisiert werden. Erwartungsgemäß sollten die Transkriptionsprofile von Proben innerhalb einer Gruppe eine sehr hohe Ähnlichkeit haben, die Gruppen untereinander allerdings sollten unterschiedliche Profile nachweisen. Diese Ähnlichkeit wird mittels farblicher Kodierung dargestellt. Hierfür werden die Werte mittels Z-Transformation standardisiert. Der Z-Wert ist dimensionslos und gibt an, um wie viele Standardabweichungen das Signal einer Probe vom Mittelwert abweicht. Ist der Wert negativ, so liegt das Signal der Probe unterhalb des Mittelwertes, in der Heatmap wird dies mit blauer Farbe dargestellt. Bei positivem Z-Wert ist das gemessene Signal stärker und wird rot dargestellt.

#### 7.6.4 Gene Set Analysis

Genexpressionsanalysen durch Verwendung von Microarrays sind zu einem wichtigen Instrument der genetischen Forschung geworden. Die Schwierigkeit liegt nicht mehr darin die Daten herzustellen, sondern vielmehr in der Interpretation der großen Datensätze.

Gene set analysis (GSA) ist ein weit verbreitetes Verfahren zur Analyse von Daten, die auf Genexpressionsanalysen basieren. Der Fokus liegt auf „Gene Sets“, also Gruppen von Genen mit ähnlicher biologischen Funktion. Somit können für eine spezifische Fragestellung die dafür relevanten Gruppen von Genen (z.B.: Gene eines Pathways) untersucht werden. GSA erfolgte in dieser Arbeit basierend auf der von Luo *et al.* vorgestellten Methode. Das hierbei durchgeführte Verfahren wird GAGE (Generally Applicable Gene-set Enrichment) genannt und ist für unterschiedlich große Datensätze geeignet. Im Vergleich zu den zwei häufigsten GSA Methoden (GSEA und PAGE) konnte GAGE bessere Ergebnisse bezüglich der Identifizierung von statistisch und biologisch relevanten regulatorischen Signalwegen erreichen (Luo *et al.*, 2009). GSA hat gegenüber der Untersuchung einiger ausgewählten Gene einige Vorteile. Zwar können bei Fokus auf spezifische Genen statistisch signifikante Unterschiede beschrieben werden, allerdings können diese ohne den biologischen oder pathophysiologischen Kontext des dazugehörigen Signalweges einschließlich der beteiligten Gene nur eingeschränkt interpretiert werden (Subramanian *et al.*, 2005).

Die Analyse der Genexpression erfolgte anhand des Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Die Darstellung der Signalwege erfolgte mittels Pathview (verfügbar über <http://Pathview.r-forge.r-project.org/>) (Luo and Brouwer, 2013).

Folgende immunologisch relevante Signalwege wurden untersucht:

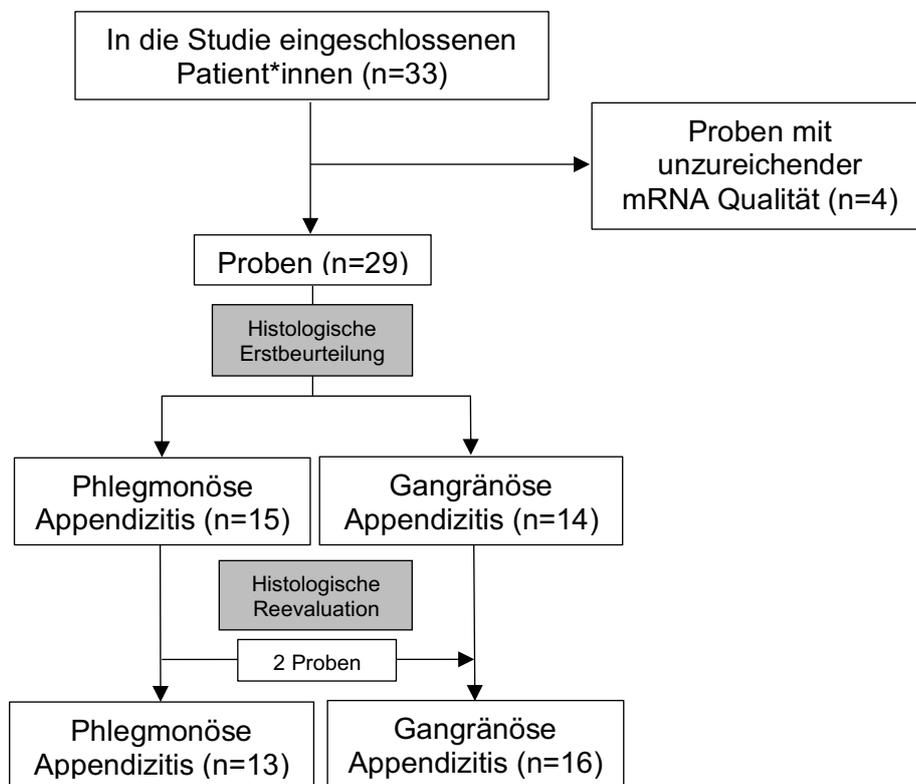
- Antigenprozessierung und -präsentation
- B-Zell-Rezeptor Signalweg
- C-Typ-Lektin-Rezeptor Signalweg
- Chemokin Signalweg
- Fc epsilon RI Signalweg
- Fc gamma R vermittelte Phagozytose
- Hämatopoetische Zellreihe
- IL-17 Signalweg

- Intestinale IgA-Produktion
- Komplementsystem und Gerinnungskaskade
- Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) vermittelte Zytotoxizität
- Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) -like Rezeptor Signalweg
- RIG-I-ähnlicher-Rezeptor Signalweg
- T-Zell-Rezeptor Signalweg
- Th1 und Th2 Differenzierung
- Th17 Differenzierung
- Toll-like-Rezeptor (TLR) Signalweg
- Transendotheliale Leukozytenmigration
- Tumornekrosefaktor (TNF) Signalweg
- Erkennung zytosolischer DNA.

## 8 Ergebnisse

### 8.1 Patientenkollektiv

Nach Ausschluss von vier Proben (siehe Abbildung 4) wurden 29 Proben anhand der routinemäßig durchgeführten histopathologischen Begutachtung in die Gruppen phlegmonöse (n=15) und gangränöse (n=14) Appendizitis aufgeteilt. Im Rahmen der pathologischen Reevaluation durch eine spezialisierte Kinderpathologin wurden zwei initial als phlegmonös beschriebene Präparate als gangränös klassifiziert. Dadurch bestand die Gruppe der phlegmonösen Appendizitis aus 13 Patient\*innen, die Gruppe der gangränösen Appendizitis aus 16 Patient\*innen.



**Abbildung 4** Übersicht der eingeschlossenen Patient\*innen (modifiziert nach Kiss *et al.*, 2021)

Das Alter der eingeschlossenen Kinder und Jugendlichen betrug 7 bis 16 Jahre (Mittelwert  $11,3 \pm 2,6$  Jahre). In der Gruppe der phlegmonösen Appendizitis lag das mittlere Alter bei  $11,5 \pm 2,7$  Jahren, in der Gruppe der gangränösen Appendizitis bei  $11,1 \pm 2,6$  Jahren. Statistisch signifikante Unterschiede fanden sich nicht.

Von den untersuchten Patient\*innen waren 14 Kinder weiblich (48,3%) und 15 männlich (51,7%). In der Gruppe der phlegmonösen Appendizitis überwog das männliche Geschlecht (n=9; 69,2%), in der Gruppe der gangränösen Appendizitis das weibliche (n=10; 62,5%) ohne statistisch signifikante Unterschiede.

Die Zeit zwischen Symptombeginn und Blutentnahme in der Rettungsstelle lag bei 28,3 ± 16,6 Stunden. In der Gruppe der phlegmonösen Appendizitis lag die Dauer bei 24 ± 12,8 Stunden (5 - 50,5 Stunden) und in der Gruppe der gangränösen Appendizitis bei 32,1 ± 18,4 Stunden (9,5 – 80,5 Stunden). Hier bestand kein statistisch signifikanter Unterschied.

**Tabelle 4** Patientencharakterisierung. Alter in Jahren, Symptombdauer in Stunden. \*Mittelwerte ± Standardabweichung (modifiziert nach Kiss *et al.*, 2021)

	<b>Alle Patient*innen</b> (n = 29)	<b>Phlegmonöse Appendizitis</b> (n = 13)	<b>Gangränöse Appendizitis</b> (n = 16)
Alter*	11,3 ± 2,6	11,5 ± 2,7	11,1 ± 2,6
Geschlecht			
Weiblich	14 (48%)	4 (31%)	10 (62,5%)
Männlich	15 (52%)	9 (69%)	6 (37,5%)
Symptombdauer bis Probengewinnung*	28,3 ± 16,6	24 ± 12,8	32,1 ± 18,4

## 8.2 Laborparameter

Die Laborwerte der eingeschlossenen Patient\*innen sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Bei einem Kind aus der Gruppe der phlegmonösen Appendizitis erfolgte lediglich die Bestimmung des kleinen Blutbildes ohne differentielle Angabe der Leukozytenpopulationen.

Das CRP war insgesamt mit 49,72 mg/l ± 51,51 mg/dl bei einem Normwert von <5 mg/l deutlich erhöht. Patient\*innen mit gangränöser Appendizitis hatten mit 71,4 mg/l ± 58,81 mg/dl im Vergleich zu 23,05 mg/l ± 19,26 mg/dl bei phlegmonöser Appendizitis einen signifikant höheren CRP-Wert (p=0,007). Statistische Signifikanz zeigte sich zudem bei

## Ergebnisse

der Untersuchung der eosinophilen Granulozyten. Mit einem p-Wert von 0,048 waren die Eosinophilen bei Patient\*innen mit phlegmonöser Appendizitis signifikant höher als bei Kindern und Jugendlichen mit gangränöser Appendizitis. Die Leukozyten aller Patient\*innen war im Mittel mit 16,97/nl  $\pm$  4,65/nl, die neutrophilen Granulozyten mit 14,04/nl  $\pm$  4,88/nl erhöht. Diese Werte waren im Vergleich der Gruppen bei Patient\*innen mit gangränöser Appendizitis höher, wobei die jeweiligen Unterschiede keine statistische Signifikanz zeigten (p=0,101 bzw. p=0,1).

**Tabelle 5** Laborwerte bei Patient\*innen mit akuter Appendizitis. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

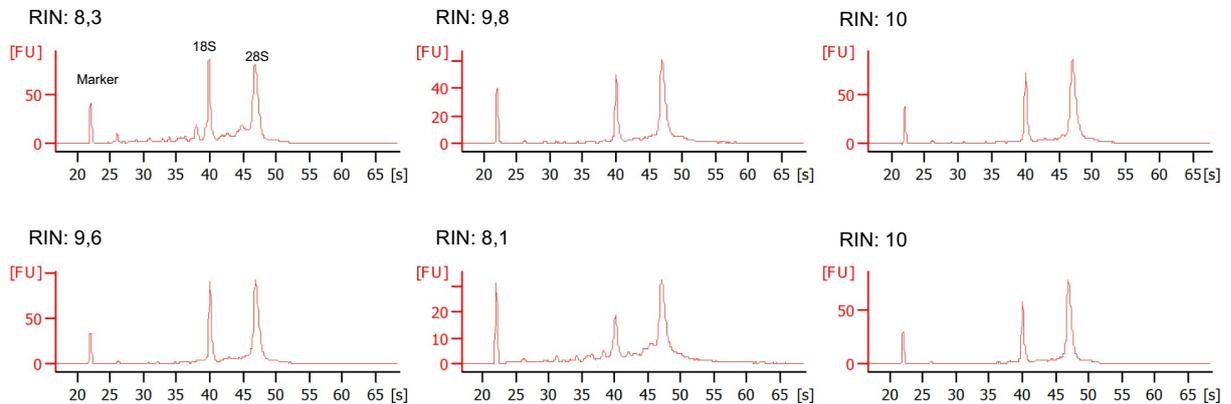
	<b>Alle Patient*innen (n=29)</b>	<b>Phlegmonöse Appendizitis (n=13)</b>	<b>Gangränöse Appendizitis (n=16)</b>	<b>p-Wert</b>
CRP [mg/l]	49,72 ( $\pm$ 51,51)	23,05 ( $\pm$ 19,26)	71,4 ( $\pm$ 58,81)	0,007
Leukozyten [/nl]	16,97 ( $\pm$ 4,65)	15,38 ( $\pm$ 4,86)	18,26 ( $\pm$ 4,03)	0,101
Neutrophile Granulozyten [/nl]	14,04 ( $\pm$ 4,88)	12,31 ( $\pm$ 5,15)	15,34 ( $\pm$ 4,23)	0,1
Unreife Granulozyten [/nl]	0,09 ( $\pm$ 0,06)	0,08 ( $\pm$ 0,05)	0,11 ( $\pm$ 0,06)	0,209
Lymphozyten [/nl]	1,56 ( $\pm$ 0,75)	1,63 ( $\pm$ 0,74)	1,51 ( $\pm$ 0,76)	0,545
Monozyten [/nl]	1,15 ( $\pm$ 0,47)	1,07 ( $\pm$ 0,54)	1,21 ( $\pm$ 0,39)	0,174
Eosinophile Granulozyten [/nl]	0,7 ( $\pm$ 0,15)	0,08 ( $\pm$ 0,10)	0,06 ( $\pm$ 0,18)	0,048
Basophile Granulozyten [/nl]	0,05 ( $\pm$ 0,04)	0,04 ( $\pm$ 0,02)	0,06 ( $\pm$ 0,05)	0,756
Erythrozyten [/pl]	4,81 ( $\pm$ 0,45)	4,87 ( $\pm$ 0,41)	4,76 ( $\pm$ 0,47)	0,379
Thrombozyten [/nl]	294,72 ( $\pm$ 64,5)	285,62 ( $\pm$ 75,35)	302,13 ( $\pm$ 52,97)	0,429

### 8.3 Genexpressionsanalyse

Zur Sicherstellung der Qualität und Reinheit der Proben erfolgte die Untersuchung mittels Bioanalyser (siehe exemplarisch Abbildung 5). Hier ist ein erster Peak zu sehen, welcher als Kontrolle gilt und den Marker darstellt. Zudem sind zwei Peaks bei den 18S und 28S Untereinheiten. Aufgrund mangelnder RNA-Qualität (RIN-Wert <8) wurden vier Proben

## Ergebnisse

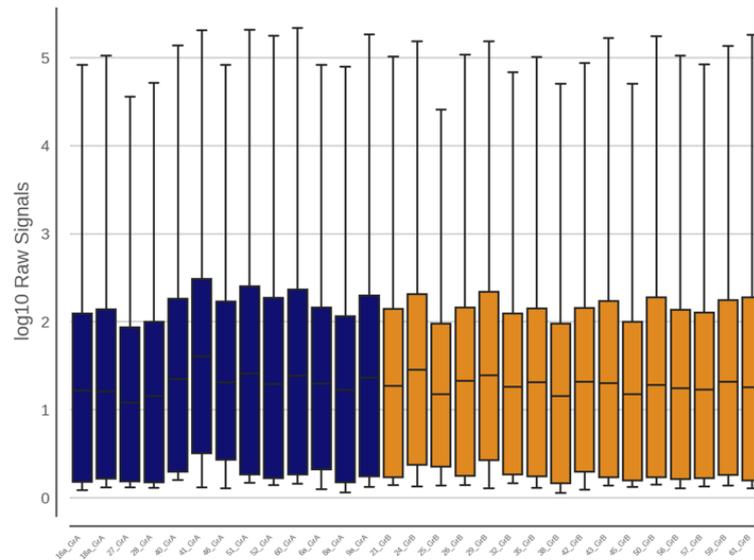
nicht weiterverarbeitet (siehe Abb. 4), alle weiterverarbeiteten Proben hatten dementsprechend einen RIN-Wert von  $\geq 8$ .



**Abbildung 5** Qualitätskontrolle durch Bioanalytiker.

Zudem erfolgte zur Qualitätssicherung die Darstellung der Signalstärke der Genexpression einzelner Proben vor der Normalisierung. Zur Visualisierung wurden Boxplots erstellt (siehe Abbildung 6). Auf der x-Achse sind die einzelnen Proben mit der jeweiligen Probennummer, sowie der Zugehörigkeit der Gruppen zu sehen (GrA vs. GrB). Links (blau markiert) sind die Proben aus „Gruppe A“, also die von Patient\*innen mit phlegmonöser Appendizitis zu sehen. Rechts (orange) sind diejenigen aus „Gruppe B“, also die Patient\*innen mit gangränöser Appendizitis. Auf der y-Achse sind die zur besseren Darstellung und Vergleichbarkeit logarithmierte Signale aufgezeichnet. Es ist eine sehr ähnliche Verteilung der einzelnen Proben zu sehen, sodass angenommen werden kann, dass sie eine ähnliche und gute Qualität haben und somit die jeweiligen Ergebnisse miteinander vergleichbar sind.

## Ergebnisse



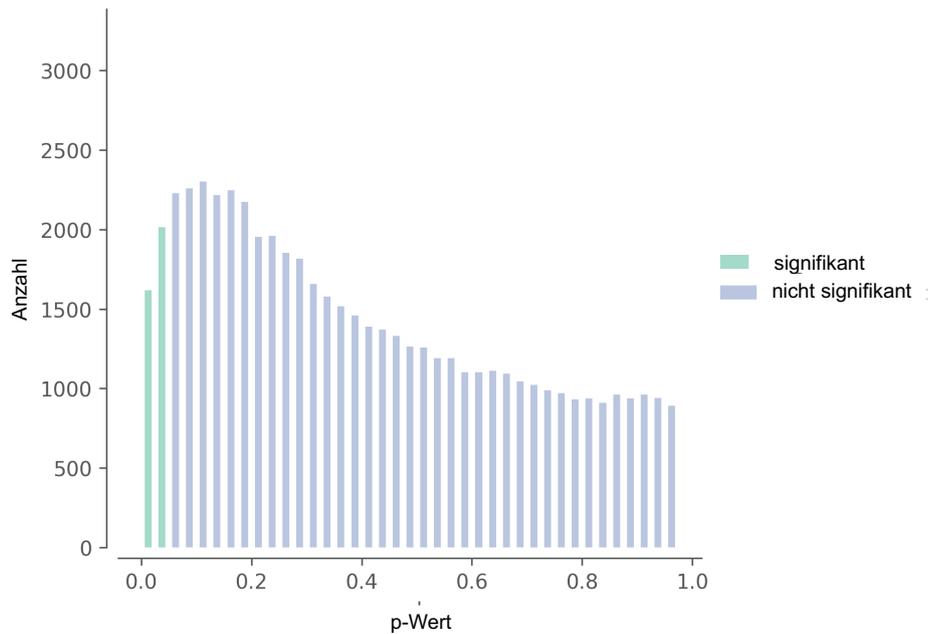
**Abbildung 6** Boxplot.

Untersucht wurden insgesamt 56 666 kodierende sowie nicht-kodierende RNA-Moleküle. Hierbei zeigte sich bei 3594, also 6,3% der untersuchten RNA eine signifikant unterschiedliche Expression zwischen den beiden Gruppen. Proben von Patient\*innen mit phlegmonöser Appendizitis wurden in Gruppe A, von Patient\*innen mit gangränöser Appendizitis in Gruppe B aufgeteilt. Die Rohdaten wurden veröffentlicht und sind über <https://osf.io/xwnr3/> frei zugänglich.

Zur besseren Interpretation der Datenmenge erfolgte eine systematische Einordnung der Gene in Signalkaskaden mittels Pathway-Analyse, um die im Rahmen dieser Fragestellung relevanten Gene zu identifizieren und die jeweiligen Ergebnisse deuten zu können.

Es wurde ein Histogramm zur Darstellung der Verteilung der entsprechenden p-Werte erstellt (Abbildung 7). Hierbei zeigt sich eine linkssteile Verteilung in Richtung niedriger p-Werte.

## Ergebnisse

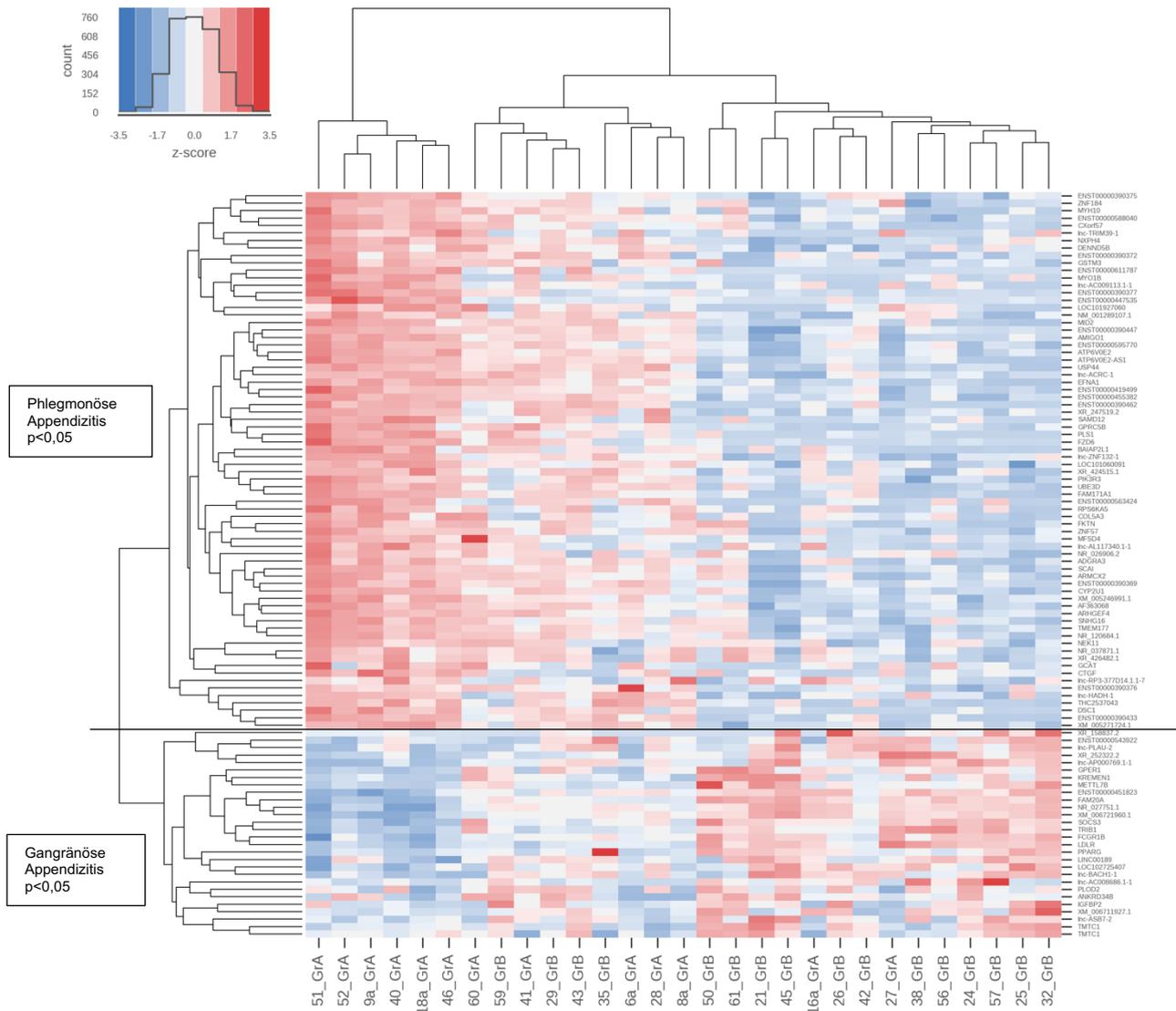


**Abbildung 7** Histogramm mit statistischer Verteilung der für die einzelnen Gene berechneten p-Werte bei phlegmonöser vs. gangränöser Appendizitis.

### 8.3.1 Top 100 differentiell exprimierte Gene

Es erfolgte zunächst die Identifizierung von 100 RNA-Molekülen bzw. den dazugehörigen Genen, die zwischen den Gruppen der phlegmonöser und gangränöser Appendizitis basierend auf den p-Werten den größten Unterschied in der Expression zeigten. Die Darstellung dieser Gene erfolgte durch die Erstellung einer Heatmap. Anhand des Dendrogramms (Abbildung 8) ist zu sehen, dass die dargestellten Gene zwei Cluster bilden. Das eine Cluster entspricht hochregulierten Genen bei Patient\*innen mit phlegmonöser Appendizitis, das andere stellt Gene mit Überexpression in der Gruppe der gangränösen Appendizitis dar.

## Ergebnisse



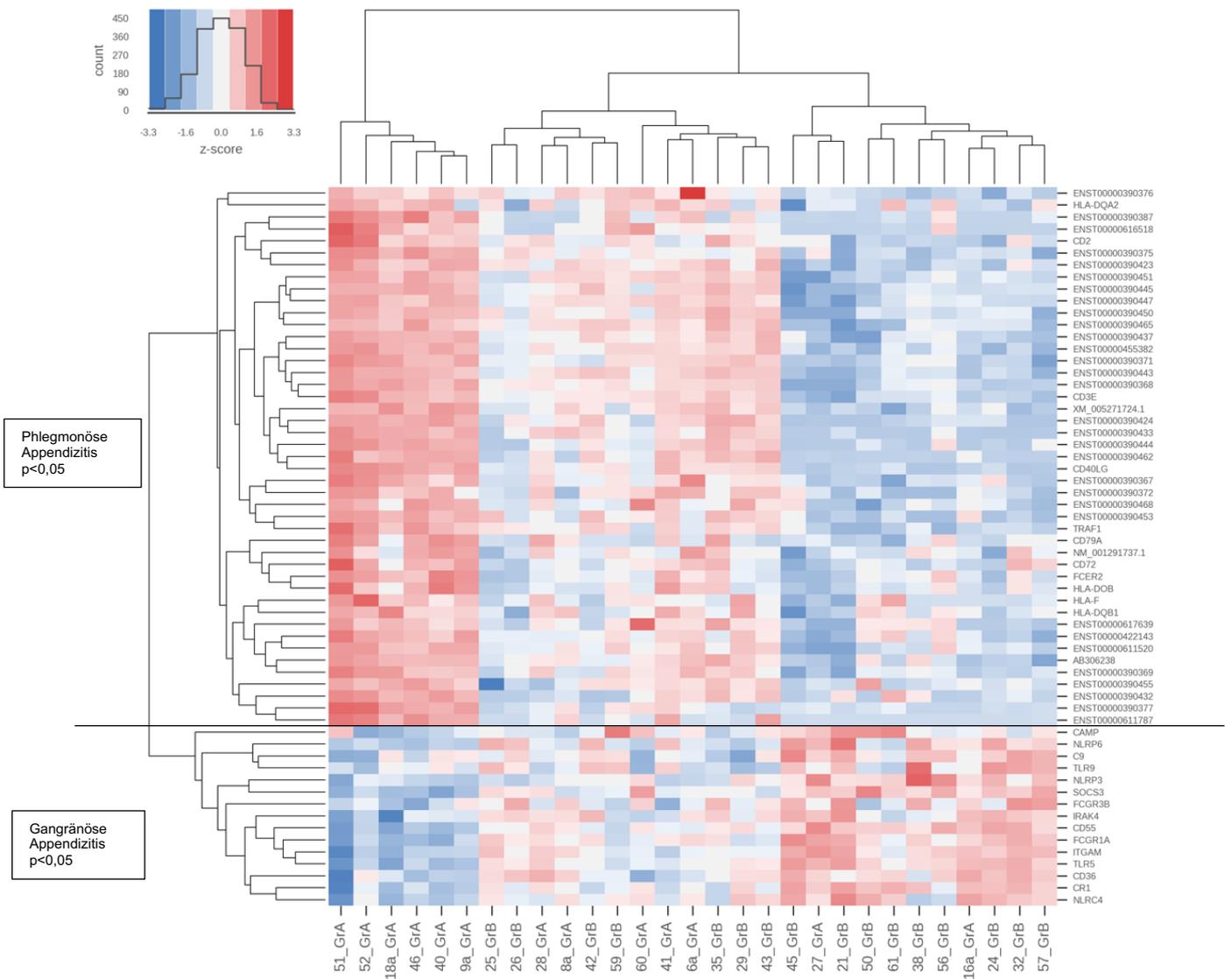
**Abbildung 8** Heatmap der Top 100 differentiell exprimierten Gene. Oberhalb der Markierung: Überexpression bei Patient\*innen mit phlegmonöser Appendizitis (GrA); unterhalb der Markierung: Überexpression bei Patient\*innen mit gangränöser Appendizitis (GrB).

### 8.3.2 Analyse der immunologisch relevanten Gene

Es erfolgte eine Analyse der signifikant hochregulierten Gene anhand von immunologischen Signalwegen.

In Abbildung 9 sind selektiv die Gene dargestellt, die anhand der immunologischen Pathways signifikante Unterschiede in der Expression zwischen den Gruppen der phlegmonösen und gangränösen Appendizitis zeigten. Anhand des Dendrogramms ist die Clusterbildung zu erkennen. Hierbei fällt auf, dass Proben einer Gruppe ein ähnliches Genexpressionsprofil aufweisen und Cluster bilden.

## Ergebnisse



**Abbildung 9** Heatmap - Darstellung der immunologisch relevanten Gene basierend auf den p-Werten. Oberhalb der Markierung: Überexpression bei Patient\*innen mit phlegmonöser Appendizitis (GrA); unterhalb der Markierung: Überexpression bei Patient\*innen mit gangränöser Appendizitis (GrB) (modifiziert nach Kiss *et al.*, 2021).

### 8.3.3 Genexpressionsprofil der phlegmonösen Appendizitis

In Tabelle 6 und 7 sind spezifisch immunfunktionelle Gene, die bei phlegmonöser gegenüber gangränöser Appendizitis hochreguliert waren, zusammengefasst. Sie kodieren für verschiedene Anteile des T-Zell-Rezeptors (TCR) bzw. des T-Zell-Rezeptor-Komplexes. Besondere Expressionsunterschiede konnten bei den TCR-Untereinheiten  $\alpha 12-1$ ,  $\alpha 19$ ,  $\alpha 35$ ,  $\alpha 41$ ,  $\beta 11-1$ ,  $\beta 11-3$ ,  $\beta 5-5$ ,  $\beta 5-6$ ,  $\beta 7-4$  und  $\beta 7-7$  gezeigt werden.

## Ergebnisse

**Tabelle 6** Zusammenfassung der Gene, die für Proteine des TCR-Komplexes kodieren und in der Gruppe der phlegmonösen Appendizitis signifikant höher exprimiert sind ( $p < 0,05$ ). \*Gene, die zu den Top 100 differentiell exprimierten Genen gehören (modifiziert nach Kiss *et al.*, 2021).

Gen	Protein	p-Wert
ENST00000390423	T cell receptor alpha variable 1-2	0,016
ENST00000390432	T cell receptor alpha variable 10	0,026
ENST00000390433	T cell receptor alpha variable 12-1*	0,007
ENST00000390437	T cell receptor alpha variable 12-2	0,032
ENST00000390444	T cell receptor alpha variable 16	0,018
ENST00000390445	T cell receptor alpha variable 17	0,044
ENST00000390447	T cell receptor alpha variable 19*	0,004
ENST00000390424	T cell receptor alpha variable 2	0,021
ENST00000390450	T cell receptor alpha variable 22	0,042
ENST00000390451	T cell receptor alpha variable 23/delta variable 6	0,021
ENST00000390453	T cell receptor alpha variable 24	0,019
ENST00000390455	T cell receptor alpha variable 26-1	0,048
ENST00000390462	T cell receptor alpha variable 35*	0,006
ENST00000390465	T cell receptor alpha variable 38-2/delta variable 8	0,028
ENST00000390468	T cell receptor alpha variable 41*	0,003
ENST00000390443	T cell receptor alpha variable 8-6	0,042
ENST00000390367	T cell receptor beta variable 11-1*	0,002
ENST00000611787	T cell receptor beta variable 11-3*	0,003
ENST00000617639	T cell receptor beta variable 14	0,045
ENST00000616518	T cell receptor beta variable 15	0,019
ENST00000611520	T cell receptor beta variable 18	0,022
ENST00000455382	T cell receptor beta variable 2	0,012
ENST00000422143	T cell receptor beta variable 29-1	0,036
ENST00000390387	T cell receptor beta variable 3-1	0,019
ENST00000390392	T cell receptor beta variable 4-2	0,013
ENST00000390372	T cell receptor beta variable 5-5*	0,002
ENST00000390375	T cell receptor beta variable 5-6 *	<0,001
AB306238	T cell receptor beta variable 6	0,013
ENST00000390368	T cell receptor beta variable 6-5	0,024
ENST00000390371	T cell receptor beta variable 6-6	0,015
ENST00000390376	T cell receptor beta variable 6-8*	0,003
ENST00000390369	T cell receptor beta variable 7-4*	0,008
ENST00000390377	T cell receptor beta variable 7-7 *	<0,001

## Ergebnisse

Die T-Zell Marker CD2 (p=0,027), CD40L (p=0,003) sowie CD3E (p=0,021) und CD3G (p=0,02) waren signifikant hochreguliert. Ebenso waren an der T-Zell-Differenzierung beteiligtes ITK (IL-2 inducible T-cell kinase, p=0,023) und NFATC3 (nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 3, p=0,045) überexprimiert.

Des Weiteren konnte im Vergleich zu den Patient\*innen mit gangränöser Appendizitis eine vermehrte Expression der B-Zell-Marker CD72 (p=0,023), CD79 (p=0,004), CD23 (p=0,01) und CD24 (p=0,021) gezeigt werden. NF-κB-inducing kinase (NIK; p=0,029), RNA Polymerase III (Pol-III; p=0,037), Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 (TRAF1, p=0,042) und Interleukin-23 (p=0,027) sowie die human leukocyte antigen (HLA) Moleküle HLA-DR (p=0,043), HLA-F (p=0,024) und HLA-DOB (p=0,017) wurden ebenso vermehrt exprimiert.

**Tabelle 7** Zusammenfassung der in der Gruppe der phlegmonösen Appendizitis signifikant hochregulierten Gene (p<0,05). \*Gene, die zu den Top 100 differentiell exprimierten Genen gehören. PA: phlegmonöse Appendizitis, GA: gangränöse Appendizitis (modifiziert nach Kiss *et al.*, 2021).

Gen	Signal PA	Signal GA	p-Wert
<b>T-Zelle</b>			
CD2	714 716	303 581	0,027
CD40L*	444 146	250 334	0,003
CD3E	224 489	121 105	0,021
CD3G*	32 329	10 429	0,002
ITK	442 787	232 313	0,023
NFATC3	81 689	47 903	0,045
<b>B-Zelle</b>			
CD72	47 388	26 991	0,023
CD79*	4383 957	3148 032	0,004
CD23	582 241	275 625	0,010
CD24	143 940	86 878	0,021
TRAF 1	147 047	92 617	0,042
NIK	149 733	83 237	0,029
Pol-III	65 737	42 029	0,037
Interleukin 23	73 747	30 069	0,027

#### 8.3.4 Genexpressionsmuster der gangränösen Appendizitis

Bei Patient\*innen mit gangränöser Appendizitis konnte im Vergleich zu denen mit phlegmonöser Appendizitis eine Hochregulierung von verschiedenen Genen gezeigt werden, diese sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

So war suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3,  $p=0,010$ ) signifikant hochreguliert. Schlüsselmoleküle des Toll-like Rezeptor (TLR) Pathways TLR5 ( $p=0,011$ ), TLR9 ( $p=0,022$ ), Interleukin-1 Rezeptor (IL-1R) assoziierte Kinase 4 (IRAK4,  $p=0,03$ ) und Tumor progression locus 2 (Tpl2/COT,  $p=0,037$ ) sowie NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3,  $p=0,034$ ), NLRP6 ( $p=0,011$ ), NLR Family CARD Domain Containing 4 (NLRC4,  $0,026$ ) und Cathelicidin ( $p=0,05$ ) als relevante Moleküle des Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) like Rezeptor Signalweges waren signifikant überexprimiert. Die Genexpression des Oberflächenmoleküls CD36 ( $p=0,023$ ) zeigte ebenso eine erhöhte Expression wie CD11b/ITGAM ( $p=0,029$ ), CD64 (Fc- $\gamma$  Rezeptor 1, Fc $\gamma$ RI,  $p=0,022$ ) und CD16b ( $p=0,032$ ). CD55 ( $p=0,032$ ), CD35 ( $p=0,022$ ) sowie Komplementfaktor C9 ( $p=0,032$ ) waren ebenso hochreguliert.

In der Gruppe der gangränösen Appendizitis wurden IL-17A ( $p=0,048$ ) und die für den IL-17-Pathway relevanten Moleküle LCN2 (Lipocalin 2,  $p=0,023$ ) sowie IL-27 ( $p=0,032$ ) als signifikant überexprimiert identifiziert.

**Tabelle 8** Zusammenfassung der bei gangränöser Appendizitis signifikant hochregulierten, immunologisch relevanten Gene ( $p < 0,05$ ). PA: phlegmonöse Appendizitis, GA: gangränöse Appendizitis (modifiziert nach Kiss *et al.*, 2021).

	Gen	Signal PA	Signal GA	p-Wert
<b>Toll-like Rezeptor Signalweg</b>				
	TLR5	753 766	1134 183	0,011
	TLR9	116 484	134 197	0,022
	IRAK4	260 254	327 357	0,030
	Tpl2	187 580	323 624	0,037
<b>NOD-like Rezeptor Signalweg</b>				
	NLRP3	135 239	187 848	0,034
	NLRC4	100 240	147 962	0,026
	NLRP6	138 765	166 789	0,011
	Cathelicidin	29 170	36 738	0,050
<b>Polymorphkernige neutrophile Granulozyten</b>				
	CD11b/ITGAM	32 351	409 037	0,029
	CD64	1048 320	1678 352	0,022
	CD16b	65 143	127 038	0,032
<b>Komplementkaskade</b>				
	C9	68 305	86 590	0,032
	CD55 /DAF	1120 581	1540 447	0,032
	CD35 /CR1	437 213	658 476	0,022
<b>IL-17-Signalweg</b>				
	IL-17A	195 978	251 080	0,048
	LCN2	162 187	275 992	0,023
	IL-27	82 570	96 370	0,032
	CD36	2159 126	3045 863	0,023
	SOCS3	1211 660	2365 561	0,010

### 8.3.5 Expression unspezifischer Gene

In der Pathwayanalyse wurden einige Expressionsunterschiede von Genen mit unspezifischen und vielfältigen zellphysiologischen Funktionen gefunden, bei denen keine eindeutige Zuordnung zu definierten inflammatorischen und immunologischen Prozessen möglich war. Diese werden in Tabelle 9 hinsichtlich ihrer Funktionen charakterisiert.

**Tabelle 9** Signifikant unterschiedlich exprimierte Gene mit unspezifischer Funktion.

AC	Adenylylzyklase	cAMP-assoziierte Prozesse (Halls and Cooper, 2017)
AP-1	Activator protein 1	Zellproliferation und -differenzierung, Apoptose (Shaulian and Karin, 2002)
Cbl (B)	Casitas B-lineage Lymphoma	Angeborene Immunantwort, Tumorentstehung (Tang, Langdon and Zhang, 2019)
CDK4	Cyclin dependent kinase 4	Reguliert den Zellzyklus (Romero-Pozuelo <i>et al.</i> , 2020)
cGAS	Cyclic GMP-AMP synthase	Synthese von cGAMP (Sun <i>et al.</i> , 2013)
cPLA2	Cytosolic phospholipase A2	Phospholipid Stoffwechsel, Signaltransduktion (Murakami <i>et al.</i> , 2017)
EPAC	Exchange proteins directly activated by cAMP	cAMP Effektor (Robichaux and Cheng, 2018)
F2	Thrombin	Hämostase (Loghmani and Conway, 2018)
F2RL2,F2RL3/ PAR3, PAR4	Coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2/3	Thrombin-Rezeptor auf Thrombozyten (Hänzelmann <i>et al.</i> , 2015)
FLT3L	Fms-related tyrosine kinase 3 ligand	Zellproliferation, Differenzierung hämatopoetischer Zellen (Kazi and Rönstrand, 2019)
HIF-1	Hypoxia-inducible factor 1	Verfügbarkeit von Sauerstoff (Semenza, 2001)
MAML1	Mastermind like transcriptional coactivator 1	Reguliert den Notch-Signalweg (Jin <i>et al.</i> , 2010)
MARCKS	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	Ubiquitäres Vorkommen, postnatale Anpassung, Entwicklung des Nervensystems (El Amri, Fitzgerald and Schlosser, 2018)
P130Cas/BCAR1	Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1	Ubiquitäres Vorkommen, Remodeling des Zytoskeletts, Zellmotilität (Matsui, Harada and Sawada, 2012)
p38-MAPK	p38- mitogenaktivierte Proteinkinase	Aktivierung durch externe Stimuli, Zelldifferenzierung und Apoptose
PIP5K	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase	Second messenger einer Großzahl von zellulären Prozessen (Khadka and Gupta, 2019)
PIR-B	Paired immunoglobulin-like receptor B	Hemmender Ig-ähnlicher Rezeptor (Munitz <i>et al.</i> , 2010)
PLD1	Phospholipase D1	Hydrolysiert Phospholipide, intrazelluläre Signaltransduktion (Selvy <i>et al.</i> , 2011)
RhoH	Ras homolog family member H	Vorkommen in hämatopoetischen Zellen, hemmt Zellwachstum (Li <i>et al.</i> , 2002)
Tm/Cd141	Thrombomodulin	Hämostase (Loghmani and Conway, 2018)

## 9 Diskussion

Obwohl die akute Appendizitis ein sehr häufiges Krankheitsbild darstellt, ist ihre Ursache weitgehend unbekannt. Die meisten Theorien bezüglich der Pathophysiologie basieren auf der Annahme, dass es im Rahmen einer mechanischen Obstruktion im Lumen der Appendix zu einer lokalen Entzündung kommt. Gegen diese Annahme spricht jedoch, dass in bis zu 27% aller Autopsien Appendikolithen ohne Zeichen einer Inflammation der Appendix nachzuweisen sind (Andreou, Blain and du Boulay, 1990). Demgegenüber existieren tierexperimentelle Untersuchungen im Kaninchenmodell, die eine intraluminale Druckerhöhung tatsächlich als Ursache für die Appendizitis möglich erscheinen lassen (Pieper, Kager and Tidfeldt, 1982). Allerdings sind sowohl der Lumendurchmesser, als auch die Länge der Appendix bei Kaninchen 3-5 Mal größer, als die mittleren korrespondierenden Messwerte beim menschlichen Wurmfortsatz. Somit ist die Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus fraglich (Smith *et al.*, 2009).

Die Theorie, dass sich die akute Appendizitis unbehandelt zwangsläufig zu einer komplizierten Appendizitis weiterentwickelt und eine Perforation zur Folge hat, wurde 1994 von Andersson *et al.* in Frage gestellt. Diese Schlussfolgerung beruht auf den Ergebnissen einer retrospektiven Untersuchung von 56 172 Patient\*innen, die bei Verdacht auf akute Appendizitis operiert wurden. Die Inzidenz der nicht perforierenden Appendizitis ist um 27% gefallen, wobei die der perforierenden Appendizitis stabil blieb. Dabei zeigte sich bei der nicht-perforierenden Appendizitis eine Abhängigkeit von der diagnostischen Genauigkeit und der Rate der im gleichen Zeitraum durchgeführten Appendektomien mit unauffälligen histopathologischen Befunden (Negativappendektomien). Die Inzidenz einer Perforation zeigte keinen Zusammenhang mit der Anzahl der insgesamt durchgeführten Laparotomien (Andersson *et al.*, 1994).

Die Annahme, dass beide Entitäten auf voneinander unabhängigen pathophysiologischen Grundlagen basieren, wird auch durch die Arbeit von Livingston *et al.* aus dem Jahr 2007 gestützt. Ihre retrospektive Kohortenstudie zeigte, dass sich von 1970 bis 2004 die Inzidenz der beiden Entitäten scheinbar unabhängig voneinander veränderte. Während die Rate der perforierenden Appendizitis stetig zunahm, zeigte sich bei der nicht perforierenden Appendizitis ein U-förmiger Kurvenverlauf mit bis 1995 sinkender Inzidenz, gefolgt von einer Zunahme (Livingston *et al.*, 2007).

Andersson *et al.* haben eine hohe Rate an Spontanheilung beschrieben, Cobben *et al.* geben die Zahl der spontanen Heilung einer Appendizitis mit 8% an (Cobben, De Mol Van Otterloo and Puylaert, 2000; Andersson, 2007).

Unterschiedliche therapeutische Optionen für die Arten der Appendizitis haben sich in den letzten Jahren herausgebildet. So haben zahlreiche Studien die konservative Therapie bei nicht perforierender Appendizitis bei erwachsenen Patient\*innen untersucht und gezeigt, dass eine rein antibiotische Therapie sicher und effektiv ist (Hansson *et al.*, 2009; Vons *et al.*, 2011). Hierdurch werden Komplikationen, die eine Appendektomie zur Folge haben kann, vermieden. Dazu zählen neben dem allgemeinen Narkoserisiko operative Komplikationen wie Infektion, Hohlorganperforation und Bridenbildung.

Die erste diesbezügliche Forschungsarbeit im Kindes- und Jugendalter wurde 2015 von Svensson *et al.* publiziert. Sie haben mit ihrer randomisiert kontrollierten Studie erstmalig Kinder mit akuter nicht perforierender Appendizitis ohne operative Therapie untersucht. Es erfolgte die Randomisierung von 50 Kindern und Jugendlichen im Alter von 5-15 Jahren mit akuter Appendizitis in die Gruppen „Appendektomie“ (n=26) und „konservative Therapie“ (n=24). Das konservative Therapieregime umfasste eine intravenöse antibiotische Therapie, die im Verlauf oralisiert wurde. Von den 24 untersuchten Patient\*innen kam es bei 22 Kindern zur klinischen Besserung, sodass keine Intervention erforderlich war. Ein Patient wurde am zweiten Tag der Antibiotikatherapie bei Ausbleiben einer klinischen Besserung operiert. Ein weiterer Patient wurde am 9. Tag des Therapieprotokolls bei erneut auftretenden abdominalen Beschwerden appendektomiert. Somit wurde erstmalig die Durchführbarkeit der antibiotischen Therapie bei nicht perforierender Erkrankung auch bei pädiatrischen Patient\*innen gezeigt (Svensson *et al.*, 2015). Im Rahmen des 5-Jahres Follow-up dieser Untersuchung wurden 11 Kinder bei Verdacht auf eine Appendizitis operiert, wobei lediglich bei 4 Kindern (17%) eine histologisch gesicherte Inflammation der Appendix nachgewiesen wurde. In dem untersuchten Zeitraum wurden 13 der initial konservativ behandelten Patient\*innen (54%) nicht appendektomiert (Patkova *et al.*, 2020).

In einer anderen Follow-up Untersuchung nach rein antibiotischer Therapie bei nicht perforierender Appendizitis im Kindes- und Jugendalter (7 bis 17 Jahre) wurden 47 Patient\*innen 5 Jahre nach der initialen Vorstellung befragt. 33 Patient\*innen wurden in diesem Zeitraum nicht appendektomiert. Vier Kinder wurden als „non-responders“

beschrieben und innerhalb der ersten sieben Tage nach Beginn der antibiotischen Therapie operiert. Zehn Patient\*innen wurden im weiteren Verlauf appendektomiert, wobei lediglich in einem Fall eine histopathologisch gangränöse Appendizitis diagnostiziert wurde. In den anderen Fällen konnte eine phlegmonöse (n=7) Appendizitis, eine nicht entzündete Appendix (n=2) sowie eine chronische Inflammation mit Fibrose (n=1) gezeigt werden (Knaapen *et al.*, 2021).

Neben den aufgezeigten Studien zeigte sich die konservative Therapie in weiteren Forschungsarbeiten als erfolgreich (Hartwich *et al.*, 2016; Hall and Eaton, 2018). Große multizentrische RCTs zur Untersuchung der konservativen Therapie bei akuter Appendizitis sind in Planung, einige Studienprotokolle wurden bereits veröffentlicht (Hall *et al.*, 2017; Vanhatalo *et al.*, 2019).

Die Problematik der prätherapeutischen Beurteilung der inflammatorischen Entitäten wird auch anhand der genannten Studien verdeutlicht. So wird etwa bei konservativer Behandlung aufgrund fehlender histopathologischer Befunde häufig von nicht perforierender bzw. perforierender Appendizitis gesprochen. Die präoperative Diagnostik, insbesondere der bildgebenden Verfahren, lässt keine genaue Differenzierung zu. In einer retrospektiven Untersuchung bei Patient\*innen mit akuter Appendizitis aus der Klinik für Kinderchirurgie der Charité – Universitätsmedizin Berlin konnte über einen Zeitraum von zehn Jahren aufgrund der histopathologischen Untersuchung in 9,8% der Fälle eine nicht perforierende, gangränöse Appendizitis nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu zeigte sich in 56% der Fälle eine phlegmonöse Appendizitis (Rawolle *et al.*, 2019). Die nicht perforierende, gangränöse Appendizitis scheint gegenüber der phlegmonösen Appendizitis einen relativ geringen Anteil auszumachen, sodass sie im Rahmen der Auswertung weiterer Parameter entsprechend deutlich weniger ins Gewicht fällt. Hier zeigt die Entwicklung der Arbeiten der Forschungsgruppe um Roland Andersson und Marie Rubèr mit anfänglichen epidemiologischen und schließlich immunologischen Untersuchungen an Patient\*innen mit vorliegenden histopathologischen Befunden nach Appendektomie, dass sich die wesentlichen pathophysiologischen Unterschiede allesamt auf der Ebene der nicht nekrotisierenden phlegmonösen gegenüber der nekrotisierenden gangränösen Appendizitis finden (Andersson *et al.*, 1994; Rubèr, 2012). Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Genexpressionsdaten bestätigen diese immunologischen Untersuchungen auf einer weiteren Ebene. Kompatibel mit diesen pathophysiologischen Erkenntnissen

finden sich ab Vorhandensein einer Gangrän bzw. mit dem Auftreten transmuraler nekrotischer Veränderungen der Appendix deutliche Assoziationen mit klinisch komplizierten Verläufen (Romano *et al.*, 2014; Imaoka *et al.*, 2016). Das relevante Kriterium ist demnach nicht die (resultierende) Perforation, sondern die (vorausgehende) Gangrän bzw. transmurale Nekrose.

## 9.1 Labor

Die in der Literatur beschriebenen Unterschiede von CRP, Leukozyten und Neutrophilen bei phlegmonöser und gangränöser Appendizitis spiegeln sich auch in dem untersuchten Patientenkollektiv wieder (Yang *et al.*, 2019). Das CRP ist mit  $p=0,007$  bei Patient\*innen mit gangränöser Appendizitis statistisch signifikant höher, als bei Kindern mit phlegmonöser Appendizitis. Die Leukozyten sowie neutrophilen Granulozyten sind ebenfalls erhöht, allerdings bei kleiner Stichprobengröße ohne statistische Signifikanz.

Minderjahn *et al.* haben eine Basophilie und Eosinophilie bei phlegmonöser Appendizitis beschrieben, allerdings ohne Über- oder Unterschreiten der jeweiligen Normwerte der Zelltypen (Minderjahn *et al.*, 2018). Tatsächlich zeigte sich auch bei den in der vorliegenden Studie untersuchten Patient\*innen ein im Mittel signifikant erhöhter Wert für die eosinophilen Granulozyten in der Gruppe der phlegmonösen Appendizitis. Es fand sich allerdings keine entsprechende Korrelation in der vorliegenden Genexpressionsanalyse. Dies kann theoretisch durch die begrenzte Patientenzahl begründet sein, möglicherweise ist die Erklärung jedoch auf einer expressionsunabhängigen Ebene zu finden: Im Rahmen inflammatorischer Prozesse kommt es grundsätzlich zu Veränderungen in der Verteilung der verschiedenen Granulozytenpopulationen im Gewebe, zu Veränderungen der Überlebenszeit und zur Induktion apoptotischer Vorgänge bei den unterschiedlichen Granulozytenformen (Geering *et al.*, 2013). Daher lässt sich der statistische Unterschied bei den eosinophilen Granulozyten möglicherweise gar nicht durch die erhöhte Produktion mit einer entsprechend veränderten Genexpression erklären, sondern stellt womöglich lediglich ein Verteilungsphänomen dar.

## 9.2 Genexpression

Zwischen den Gruppen der phlegmonösen und gangränösen Appendizitis fanden sich bei 6,3% der untersuchten Gene signifikante Unterschiede in der Expression.

Insgesamt zeigten viele der untersuchten Gene unterschiedliche Expressionssignale, allerdings ohne statistische Signifikanz. Der im entsprechenden Histogramm dargestellte Linksshift spricht dafür, dass mit einer höheren Anzahl von Proben und somit größerem Datensatz möglicherweise zusätzliche Schlüsselgene hätten identifiziert werden können.

Die in Tabelle 9 zusammengefassten Gene zeigen sehr vielfältige und unspezifische Funktionen, wobei die Relevanz dieser Gene und der dazugehörigen Proteine im Rahmen dieser Untersuchung nicht genauer einzuordnen war.

### 9.2.1 Expressionsprofil der phlegmonösen Appendizitis

Anhand der erhobenen Daten spielen bei Patient\*innen mit phlegmonöser Appendizitis im Vergleich zu der Gruppe der gangränösen Appendizitis eine Vielzahl der identifizierten Gene eine wichtige Rolle in der B- und T-Zell Interaktion und somit in der Aktivierung und Regulierung des erworbenen Immunsystems. Die B-/T-Zell vermittelte Immunantwort basiert auf der Interaktion zwischen dem TCR und einem durch ein MHC-Molekül präsentiertes Peptid. Für die adäquate Aktivierung der immunmodulatorischen Mechanismen ist zudem eine Großzahl an co-stimulatorischen Molekülen erforderlich (Courtney, Lo and Weiss, 2018).

Bei den untersuchten Patient\*innen mit phlegmonöser Appendizitis konnte eine erhöhte Genexpression von MHC und TCR-assoziierten Molekülen gezeigt werden. MHC werden beim Menschen auch als human leukocyte antigen (HLA) bezeichnet und können in zwei Klassen eingeteilt werden, MHC-I und MHC-II. Während MHC-I auf nahezu allen Körperzellen exprimiert wird, werden MHC-II Rezeptoren lediglich auf Immunzellen, wie zum Beispiel antigenpräsentierenden Zellen (antigen presenting cell, APC), B-Zellen oder Makrophagen exprimiert. Sie präsentieren Fragmente von intrazellulären Proteinen, die durch Proteasen gespalten werden. Im Falle einer durch Bakterien oder Viren infizierten Zelle werden somit auch mikrobielle Peptidfragmente präsentiert. CD8+ Zellen erkennen den MHC-I Komplex, MHC-II wird von CD4+ Zellen erkannt (Wieczorek *et al.*, 2017). Die MHC-II-Moleküle HLA-DR und HLA-DOB zeigten eine erhöhte Expression bei

phlegmonöser Appendizitis. Zur Erkennung und Bindung eines Antigens, das von einer B-Zelle oder anderen APCs präsentiert wird, ist der T-Zell-Rezeptor erforderlich, der aus zwei transmembranen Polypeptidketten besteht. Die Untereinheiten TCR $\alpha$  und TCR $\beta$  bilden ein Heterodimer und können somit die von MHC-Molekülen präsentierten Antigene erkennen und binden. Eine weitaus seltenere Form des TCR besteht aus  $\gamma$ - und  $\delta$ -Untereinheiten (Courtney, Lo and Weiss, 2018). In der Gruppe der phlegmonösen Appendizitis kodierten 10% der überexprimierten immunologisch relevanten Gene für  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten des TCR. Elf der für TCR kodierenden Gene gehörten dabei zu den „Top 100“ in Bezug auf die Gesamtheit der signifikant hochregulierten Genen. Der TCR bildet mit CD3 den so genannten TCR-Komplex, wobei CD3 lediglich der Signaltransduktion dient und nicht der Antigenerkennung bzw. -bindung. Zusammenfassend lässt sich anhand der vorgestellten Ergebnisse die phlegmonöse Appendizitis durch die Interaktion von MHC-Molekülen mit dem T-Zell-Rezeptor-Komplex und somit durch Aktivierung des erworbenen Immunsystems charakterisieren.

HLA-F zeigte eine Hochregulierung bei phlegmonöser Appendizitis. Es gehört zur Gruppe der nicht-klassischen MHC-I Moleküle und initiiert durch Interaktion mit dem NK-Zell-Rezeptor eine antivirale Immunantwort (Hò *et al.*, 2019). Dies spricht für die Möglichkeit einer antiviralen Reaktion bei phlegmonöser Appendizitis.

Die IL-2 inducible T-cell kinase (ITK) gehört zur Familie der so genannten TEC-Kinasen, die von T-Zellen exprimiert werden. Bei Stimulation des TCR bewirkt ITK durch Reorganisation des Zytoskeletts und dementsprechend veränderter Zellpolarität die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen (Schwartzberg, Finkelstein and Readinger, 2005). Der Transkriptionsfaktor NFATC3 reguliert für T-Zellen spezifische Chemokine (Lee, Kim and Choi, 2018). Somit zeigte sich anhand der Expression von ITK und NFAT eine für aktivierte T-Zellen typisches Signal.

CD40L (oder CD154), CD2, ITK, TRAF und NFAT gehören bei den untersuchten Patient\*innen mit phlegmonöser Appendizitis zu den hochregulierten Genen. CD40L ist ein von aktivierten T-Zellen exprimiertes Protein, welches die Aktivierung und Proliferation von B-Zellen induziert. Dies geschieht, indem CD40L von auf B-Zellen exprimiertem CD40 erkannt und gebunden wird. CD40 gehört zur tumor necrosis factor receptor (TNFR) Superfamilie. Die zytoplasmatische Domäne besitzt keine eigene Kinase-Aktivität, sodass die Initiierung der Signalkaskade an andere intrazelluläre

Moleküle gebunden ist. Proteine der TRAF-Familie (tumor necrosis factor receptor-associated factors, TRAF) spielen dabei eine Schlüsselrolle (Bishop *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2008). Schließlich kommt es durch die Aktivierung von NIK (NF- $\kappa$ B-inducing kinase) zur Stimulation des NF- $\kappa$ B-Signalweges (Matsumoto *et al.*, 2002). Diese Interaktion spielt eine wesentliche Rolle in der T-Zell abhängigen B-Zell-Aktivierung. Es kommt zu einer Proliferation der B-Zellen sowie zur Produktion von Zytokinen und Chemokinen (Elgueta *et al.*, 2009). Der T-Zell-Marker CD28 wurde als co-stimulatorischer Rezeptor für die B-Zell-Aktivierung beschrieben (Rölle *et al.*, 2016). Diese Gene und entsprechende Proteine unterstreichen die Aktivierung des erworbenen Immunsystems und insbesondere die Relevanz der B-/T-Zell-Interaktion im Rahmen der phlegmonösen Appendizitis.

Das Oberflächenmolekül CD23 zeigte eine signifikant erhöhte Expression in der Gruppe der phlegmonösen Appendizitis. Es wurde als IgE Rezeptor (daher teilweise als Fc $\epsilon$ R2 beschrieben) erstmals auf B-Zellen entdeckt, wird aber auch von antigenpräsentierenden Zellen und Epithelzellen des Respirations- sowie Gastrointestinaltraktes exprimiert (Fellmann *et al.*, 2015; Sutton and Davies, 2015). Bei der durch den CD40-Liganden erfolgten Stimulation von CD40 wurde eine erhöhte Expression und Freisetzung von CD23 in B-Zellen gezeigt (Sukumar *et al.*, 2006). Diesen Zusammenhang konnten die vorgestellten Ergebnisse bei den untersuchten Patient\*innen mit phlegmonöser Appendizitis ebenfalls zeigen. Zudem wurde bei erhöhter Freisetzung von IFN- $\gamma$  eine Hemmung von CD23 in B-Zellen beschrieben (Sukumar *et al.*, 2006). Da es sich bei IFN- $\gamma$  um einen Th1-vermittelten Mediator handelt, spricht die hohe Expression von CD23 gegen eine IFN- $\gamma$  assoziierte Immunantwort und für eine Assoziation mit Th2. Dies stimmt mit den von Rubè *et al.* veröffentlichten Daten überein und hebt erneut die Theorie der viralen Genese der phlegmonösen Appendizitis hervor (Rubè *et al.*, 2006).

Auch die Expression der B-Zell-Marker CD24, CD72 und CD79 war in der Gruppe der phlegmonösen Appendizitis hochreguliert. CD24 wird auf zahlreichen Zelltypen exprimiert, insbesondere auf noch undifferenzierten Zellen im Rahmen der Zellreifung. Als B-Zell-Antigen wird es im Rahmen der B-Zell-Reifung vermehrt exprimiert (Tan *et al.*, 2016). Zudem wirkt CD24 als co-stimulatorischer Faktor im Rahmen der Proliferation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Liu *et al.*, 1992). Daneben wird CD24 auch von reifenden T-Zellen exprimiert, durch Bildung des TCR/CD3 Komplexes zeigt sich eine vermehrte

Expression von CD24 (Hubbe and Altevogt, 1994; Zhou *et al.*, 1997). Es konnte bei den untersuchten Patient\*innen neben der bereits zuvor aufgezeigten erhöhten Expression von Molekülen des TCR-Komplexes auch die in der Literatur beschriebene Assoziation durch die verstärkte Freisetzung von CD24 gezeigt werden.

CD72 ist ein Membranprotein, welches als Co-Rezeptor von BCR agiert. Exprimiert wird es in allen Phasen der B-Zell-Reifung. Lediglich auf Plasmazellen ist es nicht zu finden (Adachi *et al.*, 2000; Wu and Bondada, 2002; Akatsu *et al.*, 2016). CD79 ist ein B-Zell spezifisches Protein, welches aus einem Heterodimer der Transmembranproteine CD79A (Ig- $\alpha$ ) und CD79B (Ig- $\beta$ ) besteht. Es bildet den für die Signaltransduktion relevanten Anteil des B-Zell-Rezeptors. Der BCR-Komplex ist ein Schlüsselmolekül der B-Zell-Differenzierung und beeinflusst letztlich die Immunantwort (Chu and Arber, 2001; Hardy *et al.*, 2014). Als Co-Rezeptor und Teil des B-Zell-Rezeptors stellen sich CD72 und CD79 als wichtige Regulatoren der B-Zell-assoziierten Immunantwort bei den untersuchten Patient\*innen mit phlegmonöser Appendizitis dar.

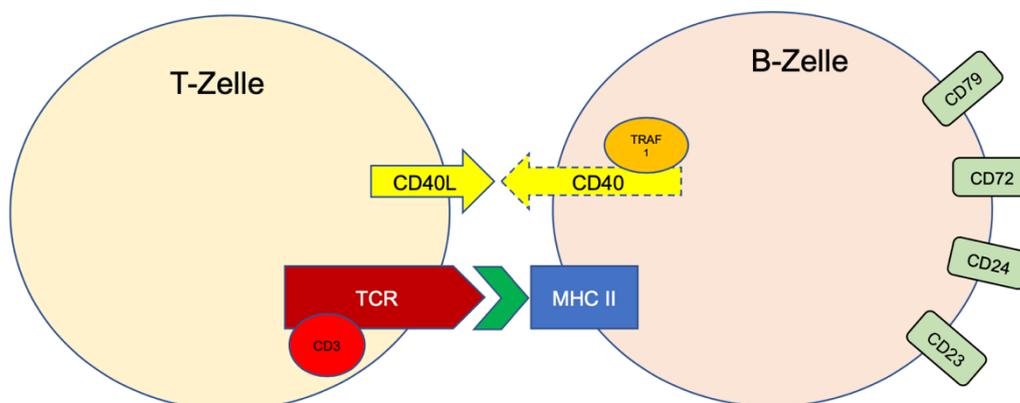
Pol-III ist ein zytosolischer DNA-Sensor, welcher die Produktion von Typ I Interferonen triggert (Chiu, MacMillan and Chen, 2009). Typ I Interferone sind spezifisch für eine antivirale Immunantwort. Sie bewirken eine Hochregulierung der MHC-I-Moleküle und erhöhen somit die Wahrscheinlichkeit, dass virusinfizierte Zellen von CD8+ zytotoxischen T-Zellen erkannt werden. Diese Erkenntnis stimmt mit der oben beschriebenen, erhöhten Expression von HLA-F überein. Zudem liefern diese Daten erneut Hinweise für die Möglichkeit der viralen Genese der phlegmonösen Appendizitis.

Das ebenso höher exprimierte p38 bildet eine aus vier Mitgliedern bestehende Familie von Proteinkinasen (Mitogen-activated protein kinase, MAPK). Der p38-Signalweg wird im Rahmen einer Immunreaktion oder Stress sowie in T-Zellen bei einer TCR-vermittelten Reaktion aktiviert. Dies stimmt mit den bereits vorgestellten Ergebnissen überein. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass p38 eine große funktionelle Vielfalt hat und in multiplen Signalkaskaden vorkommt (Cuadrado and Nebreda, 2010). Somit ist eine Aussage bezüglich der Funktion der MAPK bei phlegmonöser Appendizitis nicht ausreichend einzuordnen.

Ebenso war der FMS-like tyrosine kinase 3 Ligand (FLT-3 Ligand) hochreguliert, bei Bindung an FLT-3 wird durch Autophosphorylierung die Zellproliferation, das

Zellüberleben und die Differenzierung der hämatopoetischen Zellen aktiviert und reguliert. Dies führt sowohl im Gesunden, als auch unter pathologischen Bedingungen zu einer sehr vielfältigen Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, sodass letztlich die Bedeutung von FLT-3 Ligand bei der akuten Appendizitis nach aktuellem Wissensstand nicht genauer eingeordnet werden kann (Kazi and Rönstrand, 2019).

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Untersuchung gezeigt werden, dass die untersuchten Patient\*innen mit phlegmonöser Appendizitis nicht nur erhöhte Expressionsmuster für den TCR und die MHC-Moleküle aufwiesen, sondern auch die Co-Stimulatoren der B-/T-Zell Interaktion CD40L, NIK, TRAF und CD2 vermehrt exprimiert waren. Zudem zeigten sich zahlreiche B-Zell Marker hochreguliert. Dazu gehören CD23, CD24, CD72 und CD79. Abbildung 10 stellt diese Interaktion der B-/T-Zellen und die dazugehörigen hochregulierten Gene bzw. Proteine dar. Diese Erkenntnisse sprechen für die Aktivierung einer spezifischen immunologischen Synapse. Dieser interzelluläre Kontakt scheint insbesondere für die Induktion einer spezifischen antiviralen Immunantwort relevant zu sein. So führt die Internalisierung, Degradation und MHC II-abhängige Präsentation von Viren bzw. Viruspartikeln über B-Zellen nach Aktivierung durch Th2-Zellen über den TCR/CD3-Rezeptorkomplex und Co-Stimulation über CD40/CD40L zur reziproken Zytokinaktivierung der B-Zellen und Induktion einer spezifischen humoralen Immunantwort auf eine mögliche Virusinfektion (Clevers *et al.*, 1988; Adachi *et al.*, 2000; Szomolanyi-Tsuda *et al.*, 2000; Chu and Arber, 2001).



**Abbildung 10** Schematische Darstellung der hochregulierten Gene und dazugehörigen Proteine bei untersuchten Patient\*innen mit phlegmonöser Appendizitis.

Die zuvor beschriebenen immunologischen Zusammenhänge und die entsprechenden Genexpressionsprofile der untersuchten Patient\*innen sprechen somit für die Möglichkeit einer antiviralen Immunantwort bei phlegmonöser Appendizitis. Insbesondere der Umstand, dass die spontane Regredienz der phlegmonösen Appendizitis in der Literatur beschrieben wurde, stützt diese These (Andersson, 2007). In der Vergangenheit wurde eine Inflammation der Appendix im Rahmen generalisierter viraler Infektionen (insbesondere bei Lymphadenitis mesenterialis oder Invagination) beschrieben (Guarner *et al.*, 2003). Zu den am häufigsten nachgewiesenen Viren in einem Appendektomiepräparat gehören das Adenovirus, das Masernvirus, das Zytomegalievirus und das Epstein-Barr-Virus (Lamps, 2010). Grynspan und Rabah konnten erstmalig bei Patient\*innen mit klinisch akuter Appendizitis Adenoviren im Appendektomiepräparat nachweisen (Grynspan and Rabah, 2008).

### 9.2.2 Expressionsprofil der gangränösen Appendizitis

Bei Patient\*innen mit gangränöser Appendizitis waren insbesondere Gene der TLR-, NLR- und IL-17 Signalkaskade hochreguliert. Zudem konnten Marker von Monozyten und neutrophilen Granulozyten identifiziert werden. Diese hochregulierten Proteine sind in Abbildung 11 zusammengefasst.

Bei Kindern und Jugendlichen mit gangränöser Appendizitis konnte eine Hochregulierung von TLR gezeigt werden. Diese Rezeptoren sind Glykoproteine, die in der Zellmembran oder in der endosomalen Membran vorliegen können. Bislang wurden zehn menschliche TLRs identifiziert, sie besitzen eine mit Interleukin-1 Rezeptoren gemeinsame intrazelluläre Domäne. Nach der Ligandenbindung kommt es (mit Ausnahme bei TLR3) zu einer Signalweiterleitung durch das myeloid differentiation primary-response Protein 88 (MyD88). Bei Aktivierung des Signalweges kommt es zur Rekrutierung des IL-1R-associated-kinase-Komplexes (IRAK; (Blander and Sander, 2012). IRAK stellt eines der wichtigsten TLR-spezifischen Kinasen dar und ist somit essenziell für die Signaltransduktion (Lin, Lo and Wu, 2010). Bei der Aktivierung des Signalweges kommt es zu einer Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, insbesondere zur Aktivierung des nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) Singalweges. Somit kommt es zur gesteigerten Expression von zahlreichen proinflammatorischen Zytokinen, wie z.B. TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 und IL-12. Im Rahmen eines seltenen, angeborenen Immundefekts durch einen Mangel an IRAK4 kommt es vermehrt zu pyogenen bakteriellen Infektionen, die tödlich verlaufen

können (Picard, Casanova and Puel, 2011). Diese Ergebnisse deuten eindeutig auf eine bakterielle Infektion und entsprechender Immunreaktion bei gangränöser Appendizitis.

Tpl2 (Tumor progression locus 2, auch Cancer Osaka thyroid, COT) wird primär in Zellen des unspezifischen Immunsystems (dendritische Zellen, Makrophagen und neutrophile Granulozyten) exprimiert und spielt im Rahmen einer Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle. In Makrophagen ist Tpl2 für die Produktion von TNF $\alpha$  erforderlich (Xu *et al.*, 2018). Diese Zusammenhänge und die dementsprechend relevanten Signalwege bei der gangränösen Appendizitis sprechen für eine Aktivierung des unspezifischen Immunsystems.

Neben dem TLR-Signalweg spielte auch der NOD-like Signalweg eine wichtige Rolle im Rahmen einer gangränösen Appendizitis. NLRP3 und NLRC4 gehören zu den am besten untersuchten Inflammasomen und zeigten bei den untersuchten Patient\*innen eine erhöhte Genexpression. NLRP3 wird durch Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. pathogen-associated molecular pattern, PAMP) und zahlreiche Schaden-assoziierte molekulare Muster (engl. Damage-associated molecular patterns, DAMP) wie z.B. Harnsäurekristalle, aus Mitochondrien freigesetztes ATP, Siliciumdioxidkristalle und Aluminiumhydroxide aktiviert. NLRC4 wird durch Flagellin und Bestandteilen des Typ-III-Sekretionssystems gramnegativer Bakterien aktiviert (Man *et al.*, 2014). Die genaue Funktion von dem ebenfalls erhöht exprimierten NLRP6 ist aktuell unbekannt, allerdings konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen von bakteriellen Infektionen aktiviert wird (Ghimire *et al.*, 2020). Die bei den untersuchten Patient\*innen nachgewiesene Aktivierung des NOD-Signalweges weist auf eine bakterielle Immunantwort hin. Hierbei ist die beschriebene Aktivierung von NLRC4 durch Flagellin und anderen Bestandteilen von insbesondere gramnegativen Bakterien von großer Relevanz, da dies mit dem am Häufigsten nachgewiesenen Keimspektrum im Appendixabstrich übereinstimmt.

Cathelicidin zeigte eine ebenfalls erhöhte Expression bei den untersuchten Kindern und Jugendlichen mit gangränöser Appendizitis. Cathelicidin ist ein antimikrobielles Peptid, welches primär von neutrophilen Granulozyten freigesetzt wird. Es kann die mikrobielle Membran zerstören, sodass der Erreger rasch abgebaut wird. Es aktiviert zudem verschiedene immunmodulatorische Mechanismen und spielt eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität (Zanetti, 2004). Auch das legt eine im Vergleich zur phlegmonösen Appendizitis rein bakterielle Genese dar.

Die Oberflächenmoleküle CD55, CD35 sowie der Komplementfaktor C9 wurden ebenfalls als signifikant hochreguliert beschrieben. Im Rahmen einer Infektion spielt das Komplementsystem eine außerordentliche Rolle. Funktion des Komplementsystems ist die Bildung des Membranangriffskomplexes (membrane attack complex, MAC), die Opsonierung und die Chemotaxis (Dunkelberger and Song, 2010). CD35 (auch complement receptor 1, CR1) wird von einer Großzahl der peripher zirkulierenden Blutzellen exprimiert. Es bindet mit hoher Affinität das Komplement C4b und C3b. Es bewirkt unter anderem die Phagozytose durch neutrophile Granulozyten und Monozyten. Zudem spielt es eine Rolle in der Infektionsabwehr durch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und Prostaglandine (Dunkelberger and Song, 2010). Der Membranangriffskomplex wird aus den Komplementfaktoren C5b, C6, C7, C8 und C9 gebildet. Der C5b678-Komplex rekrutiert multiple C9 Faktoren, sodass es zu der Bildung einer ringförmigen Pore in der Membran der Zielzelle und somit zur Lyse der Zelle kommt (Dudkina *et al.*, 2016). CD55 (auch Decay-accelerating factor, DAF genannt) ist ein zentrales Protein, welches eine wichtige Rolle in der Regulation des Komplementsystems spielt. Im Rahmen der Komplementaktivierung kommt es unabhängig vom Aktivierungsweg zur Bildung der C3-Konvertase, welche C3 spaltet und somit ein wesentliches Protein der Aktivierungskaskade ist. DAF bindet die C3-Konvertase, wodurch die Spaltung von C3 gehemmt wird. Somit wird eine überschießende, destruktive Komplementaktivierung gehemmt und eine Schädigung des betroffenen Gewebes verhindert (Ozen *et al.*, 2017). Diese Ergebnisse beschreiben die Bedeutsamkeit des Komplementsystems bei gangränöser im Vergleich zu phlegmonöser Appendizitis.

CD36 gehört zu den Klasse B Scavenger Rezeptoren und war bei gangränöser Appendizitis signifikant überexprimiert. Es befindet sich auf der Oberfläche von verschiedenen Zelltypen, insbesondere auf Thrombozyten, Endothelzellen und Makrophagen. Der Rezeptor ist für zahlreiche physiologische, aber auch pathologische Vorgänge essenziell. Hierzu zählen neben Angiogenese, Fettstoffwechsel und Phagozytose der Abbau apoptotischer Zellen. Zudem konnte gezeigt werden, dass CD36 als Rezeptor für eine Vielzahl von Bakterien, die Phagozytose induzieren, relevant ist und Signalwege von insbesondere gramnegativen Bakterien beeinflusst (Baranova *et al.*, 2008). Dadurch kann erneut die bakterielle Immunantwort der gangränösen Appendizitis aufgezeigt werden.

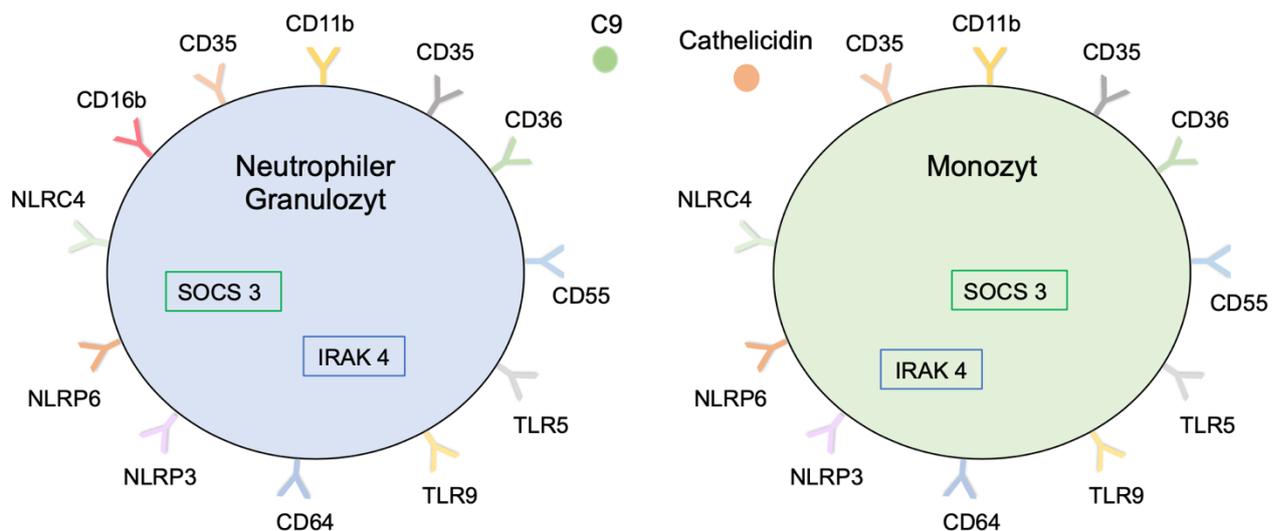
CD11b, CD64 und CD16b sind Zelladhäsionsmoleküle, die bei Patient\*innen mit gangränöser Appendizitis signifikant hochreguliert waren. CD16b ist ein IgG-Rezeptor, der zusammen mit CD32a konstant auf der Zelloberfläche vom polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) exprimiert wird. Ein zentraler Unterschied zwischen den Rezeptoren ist, dass CD16b ausschließlich von PMN exprimiert wird und somit für diese Zellpopulation spezifisch ist. PMN spielen eine wesentliche Rolle im Rahmen akuter Entzündungsreaktionen, indem sie gezielt an den Infektionsherd migrieren. Es kommt zur Phagozytose und somit zur räumlichen und zeitlichen Limitation der Infektion mit dem Ziel, eine generalisierte bakterielle Dissemination zu verhindern (Malech, DeLeo and Quinn, 2020). CD64, auch Fc- $\gamma$  Rezeptor 1 (Fc $\gamma$ RI) genannt, wird unter anderem auf neutrophilen Granulozyten exprimiert, bindet Immunglobulin G (IgG) und initiiert die Phagozytose von Bakterien. Dieser Rezeptor wird in ruhenden neutrophilen Granulozyten in sehr geringer Anzahl exprimiert, im Rahmen einer bakteriellen Infektion kommt es innerhalb von wenigen Stunden zu einer signifikant erhöhten Expression (Fernandes *et al.*, 2006). Wegen dieser besonderen Eigenschaft wird er vermehrt als potentieller Biomarker für bakterielle Infektionen im Rahmen einer Sepsis diskutiert (Wang *et al.*, 2015). CD16 (Fc $\gamma$ RIII) ist ein Transmembranprotein, welches das Fc-Fragment von IgG bindet. Es kommt zur Freisetzung einer Großzahl von zytolytischen und proinflammatorischen Faktoren (Romee *et al.*, 2013). CD11b bildet mit CD18 den Komplement Rezeptor 3 (CR3) und gehört zu den  $\beta$ -Integrin Adhäsionsproteinen (Wagner *et al.*, 2001). Es bewirkt die Migration neutrophiler Granulozyten zum Ort der Inflammation. Die Expression von CD11b steigt, sobald es zu einer bakteriellen Infektion kommt (O'Hare *et al.*, 2015). Stockinger *et al.* haben zudem eine mögliche Interaktion zwischen CD11b und CD16b beschrieben und die Hypothese aufgestellt, dass CD11b ein transmembraner Signaltransduktor für CD16b ist (Stockinger, 1997). Die Aktivierung von Neutrophilen - insbesondere die von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten - unterstreicht die bakterielle Dignität und auch den septischen Krankheitsverlauf der gangränösen Appendizitis. Die signifikant höher exprimierten Marker CD11b, CD64 und CD16b zeigen somit eine Aktivierung der PMNs bei gangränöser Erkrankung. Dies spricht für grundlegende immunologische Unterschiede der Entitäten.

Die IL-17/IL-23-assoziierte Immunantwort scheint bei gangränöser Appendizitis eine zentrale Rolle zu spielen. An dieser Stelle muss betont werden, dass zu den jeweiligen Zeitpunkten der Probengewinnung von bereits ausgeprägten inflammatorischen und

immunologischen Prozessen und entsprechenden gegenregulatorischen Mechanismen auszugehen ist. Bereits die jeweilige Symptombdauer bei den Patient\*innen mit phlegmonöser oder gangränöser Appendizitis betrug zum Zeitpunkt der Blutentnahme im Mittel 24 bzw. 32 Stunden. Das Interleukin 17A war in der Gruppe der Patient\*innen mit gangränöser im Vergleich zu denen mit phlegmonöser Appendizitis zum Zeitpunkt der Probengewinnung signifikant hochreguliert. IL-17 fasst eine Familie von sechs Zytokinen (IL-17A-F) zusammen, wobei IL-17A durch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen eine wesentliche Rolle in der Immunabwehr gegen extrazelluläre Pathogene spielt. Es kommt zur Migration von neutrophilen Granulozyten, einer lokalen Gewebsdestruktion und dient somit als Schutz vor Pathogenen (Iwakura *et al.*, 2011). Dies stimmt mit den Untersuchungen von Rubèr *et al.* überein (Rubèr *et al.*, 2010). Zunächst wurde die Freisetzung von IL-17 ausschließlich mit T-Zellen assoziiert. Jedoch konnte gezeigt werden, dass auch Zellen des angeborenen Immunsystems wie neutrophile Granulozyten, Monozyten und NK-Zellen IL-17A produzieren können und damit eine wesentliche Rolle im Rahmen einer bakteriellen Infektion spielen (Cua and Tato, 2010). Shibata *et al.* haben zudem nachweisen können, dass es im Rahmen einer Infektion mit *E. coli* zu einer schnellen und transienten Produktion und Freisetzung von IL-17 kommt (Shibata *et al.*, 2007). Dies ist insbesondere interessant, da *E. coli* bei einer perforierenden Appendizitis im intraabdominellen Abstrich mit 64-69 % der am häufigsten nachgewiesene Erreger ist (Song *et al.*, 2018; Turel *et al.*, 2019). Zudem scheint IL-17 ein wichtiges Zytokin bei der Entstehung der Sepsis zu sein, wobei die genauen Mechanismen noch unklar sind (Flierl *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012). Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3) war in der Gruppe der gangränösen im Vergleich zur phlegmonösen Appendizitis stärker exprimiert. Zudem konnte in den Genexpressionsdaten der Patient\*innen mit gangränöser Appendizitis eine im Vergleich erniedrigte Freisetzung von sowohl IL-23A als auch dem entsprechenden Rezeptor (IL-23R) gezeigt werden. Diese Beobachtungen sind am ehesten als gegenregulatorischen Effekt im Rahmen der IL-17/IL-23-assoziierten Immunantwort zu interpretieren: IL-17A ist in der Lage, die Sekretion von IL-23 über einen negativen Feedback-Mechanismus zu reduzieren (Silverpil *et al.*, 2013). Zudem kann SOCS3 die Expression von IL-23 mit entsprechenden Folgen für die IL-17A-Expression negativ beeinflussen (Chen *et al.*, 2006). Die Expression von SOCS3 wird im Wesentlichen durch IL-27 induziert, das in der Gruppe der gangränösen Appendizitis signifikant höher exprimiert war (Schneider *et al.*, 2011). Diese Mechanismen dienen der Kontrolle bzw. Begrenzung der Th17-assoziierten

Immunantwort. Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse lassen sich im Rahmen dieser beschriebenen Mechanismen in einen sinnvollen Zusammenhang bringen und unterstreichen sowohl die bakterielle Dignität, als auch den potentiell septischen Krankheitsverlauf der gangränösen Appendizitis.

Das ebenfalls im Vergleich überexprimierte LCN2 ist ein essenzieller Teil der antimikrobiellen Immunreaktion, indem es die Eisenaufnahme der Bakterien und somit deren Wachstum hemmt (Wang *et al.*, 2019). Studien haben diese Eigenschaft im Rahmen von Infektionen mit *E. coli* und anderen gramnegativen Erregern nachgewiesen (Berger *et al.*, 2006; Coorens *et al.*, 2019). Auch dies spricht dafür, dass bei Patient\*innen mit gangränöser Appendizitis Immunmechanismen im Vordergrund stehen, die für die Abwehr von Bakterien und in der Entstehung einer Sepsis relevant sind.



**Abbildung 11** Schematische Darstellung der hochregulierten Gene und dazugehörigen Proteine bei untersuchten Patient\*innen mit gangränöser Appendizitis

### 9.3 Schlussfolgerung

Mit der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig das Genexpressionsprofil von Patient\*innen mit phlegmonöser und gangränöser Appendizitis untersucht und gegenübergestellt. Infolge der spezifisch immunologischen Pathway-Analyse auf mRNA Ebene konnte bei Kindern und Jugendlichen mit gangränöser Appendizitis im Vergleich zu jenen mit phlegmonöser Appendizitis Genexpressionsmuster gezeigt werden, die typischerweise

mit einer antibakteriellen Immunreaktionen assoziiert sind. Neben der Beschreibung von für antibakterielle Mechanismen typischen Oberflächenmarkern und Signalkaskaden weisen insbesondere die IL-17/IL-23-assoziierten Expressionsmuster im Gesamtzusammenhang auf eine im Vergleich zur phlegmonösen Appendizitis betont antibakterielle Immunantwort hin. Demgegenüber weisen die Beobachtungen bei Patient\*innen mit phlegmonöser Appendizitis auf eine virale Genese der Erkrankung hin. Hier sind insbesondere die zahlreichen nur in dieser Gruppe im Vergleich signifikant erhöhten Expressionen von T-Zell-Untereinheiten auffällig. Typisch antivirale T-/B-Zell-Interaktionen werden durch Expressionsmuster nahegelegt, die plausibel eine dahingehend spezifische interzelluläre Synapse charakterisieren. Diese Beobachtungen stimmen mit der Hypothese überein, dass den Entitäten der akuten Appendizitis verschiedene Arten der Inflammation mit spezifischen Immunmechanismen zu Grunde liegen.

### 9.4 Limitationen

Eine wesentliche Limitation der vorgestellten Studie besteht in der Anzahl der untersuchten Patient\*innen (n=29). Diese war durch ethische Erwägungen und Vorgaben für die Proof-of-Concept-Studie mit Patient\*innen aus einer besonders vulnerablen Altersgruppe begründet. Sehr viele der untersuchten Gene zeigten eine erhöhte Expression, allerdings ohne statistische Signifikanz. Der im Histogramm dargestellte Linksshift spricht dafür, dass mit einer höheren Anzahl von Proben und somit größerem Datensatz möglicher Weise weitere Schlüsselgene hätten identifiziert werden können. Andererseits können die gefundenen Unterschiede zwischen den Gruppen theoretisch zufällig gemeinsam auftreten. Dagegen spricht, dass die Genexpressionsmuster inhaltlich und auch vor dem Hintergrund der Literatur sehr konklusiv sind. Insbesondere die hochsignifikante Überexpression der zahlreichen T-Zell-Untereinheiten ausschließlich bei Patient\*innen mit phlegmonöser im Vergleich zu jenen mit gangränöser Appendizitis macht eine Fehlinterpretation der Daten unwahrscheinlich.

Die zentrale Voraussetzung für Folgestudien ist die Untersuchung einer größeren Stichprobe. Die aktuelle Studie erlaubt die Berechnung der notwendigen Stichprobengröße und stellt somit eine wichtige Voraussetzung dar. Zudem sollten die Ergebnisse der Microarray-Analyse durch weitere Methoden, zum Beispiel mittels real-

time reverse transcription-polymerase chain reaction (real-time RT-PCR), bestätigt werden. Die Microarray-Analyse ist zwar eine etablierte und zuverlässige Methode, eine Validierung der Ergebnisse mit anderen Methoden ist jedoch wünschenswert.

## 9.5 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit unterstützen die seit mehreren Jahren postulierte These, dass die gangränöse Appendizitis nicht aus der phlegmonösen entsteht, sondern eine eigene Entität mit unterschiedlichen immunologischen Mechanismen darstellt. Diese Arbeit liefert Proof-of-Concept und leistet somit einen wichtigen Beitrag für das pathophysiologische Verständnis für eines der häufigsten kinderchirurgischen Krankheitsbilder.

Die erhobenen Daten bieten eine Grundlage für weiterführende Genexpressionsstudien, um die vorliegenden Expressionsmuster auf Basis einer umfangreicheren Datenlage zu validieren und perspektivisch spezifische Marker für die phlegmonöse und/oder gangränöse Appendizitis identifizieren zu können. Ebenso wäre die Durchführung von funktionellen Immunoassays auf zellulärer Ebene zur Klärung der pathophysiologischen Prozesse anzustreben. In Zukunft könnte dies im Rahmen der routinemäßig durchgeführten Blutentnahme die Möglichkeit bieten, die Art der Appendizitis zu bestimmen und eine dementsprechend spezifische Therapie einzuleiten. Wenn sich im Rahmen entsprechender umfangreicher Folgestudien die Hinweise auf eine virale Genese der phlegmonösen Appendizitis mit regelhafter spontaner Rückbildung der Entzündung zum Beweis verdichten sollten, ist eine Erweiterung der Behandlungsoptionen bis hin zur konservativen Therapie ohne Antibiose nicht auszuschließen.

Ein weiterer, sehr moderner und untersucherunabhängiger Ansatz zur differenzierten Diagnosestellung der akuten Appendizitis ist die Verwendung von Algorithmen aus maschinellem Lernen und künstlicher Intelligenz. Durch die vorgestellte Studie steht mit der durchgeführten Genexpressionsanalyse im Vergleich zu routinemäßig untersuchten Laborparametern oder anamnestischen Angaben ein viel größerer Datenpool zur Verfügung. Im Rahmen von weiterführenden Untersuchungen wäre es möglich, neue Biomarkersignaturen mit Potenzial zur verlässlichen Differenzierung der Entitäten zu definieren.

## 10 Literaturverzeichnis

- Adachi, T., Wakabayashi, C., Nakayama, T., Yakura, H. and Tsubata, T. (2000) 'CD72 Negatively Regulates Signaling Through the Antigen Receptor of B Cells', *The Journal of Immunology*, 164(3), pp. 1223–1229. doi: 10.4049/jimmunol.164.3.1223.
- Addiss, D. G., Shaffer, N., Fowler, B. S. and Tauxe, R. V. (1990) 'The epidemiology of appendicitis and appendectomy in the united states', *American Journal of Epidemiology*, 132(5), pp. 910–925. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a115734.
- Akatsu, C., Shinagawa, K., Numoto, N., Liu, Z., Ucar, A. K., Aslam, M., Phoon, S., Adachi, T., Furukawa, K., Ito, N. and Tsubata, T. (2016) 'CD72 negatively regulates B lymphocyte responses to the lupus-related endogenous toll-like receptor 7 ligand Sm/RNP', *The Journal of experimental medicine*. The Rockefeller University Press, 213(12), pp. 2691–2706. doi: 10.1084/jem.20160560.
- Akmese, O. F., Dogan, G., Kor, H., Erbay, H. and Demir, E. (2020) 'The Use of Machine Learning Approaches for the Diagnosis of Acute Appendicitis', *Emergency Medicine International*, 2020, pp. 1–8. doi: 10.1155/2020/7306435.
- Alloo, J., Gerstle, T., Shilyansky, J. and Ein, S. H. (2004) 'Appendicitis in children less than 3 years of age: A 28-year review', *Pediatric Surgery International*, 19, pp. 777–779. doi: 10.1007/s00383-002-0775-6.
- Almström, M., Svensson, J. F., Patkova, B., Svenningsson, A. and Wester, T. (2017) 'In-hospital surgical delay does not increase the risk for perforated appendicitis in children', *Annals of Surgery*, 265(3), pp. 616–621. doi: 10.1097/SLA.0000000000001694.
- El Amri, M., Fitzgerald, U. and Schlosser, G. (2018) 'MARCKS and MARCKS-like proteins in development and regeneration', *Journal of biomedical science*. BioMed Central, 25(1), p. 43. doi: 10.1186/s12929-018-0445-1.
- Anderson, J. E., Bickler, S. W., Chang, D. C. and Talamini, M. A. (2012) 'Examining a common disease with unknown etiology: Trends in epidemiology and surgical management of appendicitis in California, 1995-2009', *World Journal of Surgery*, 36(12), pp. 2787–2794. doi: 10.1007/s00268-012-1749-z.
- Andersson, R. E. (2004) 'Meta-analysis of the clinical and laboratory diagnosis of appendicitis', *BJS (British Journal of Surgery)*, 91(1), pp. 28–37. doi: 10.1002/bjs.4464.
- Andersson, R. E. (2007) 'The natural history and traditional management of appendicitis revisited: Spontaneous resolution and predominance of prehospital perforations imply that a correct diagnosis is more important than an early diagnosis', *World Journal of Surgery*, 31(1), pp. 86–92. doi: 10.1007/s00268-006-0056-y.
- Andersson, R. E., Hugander, A., Thulin, A., Nystrom, P. O. and Olaison, G. (1994) 'Indications for operation in suspected appendicitis and incidence of perforation', *Bmj*, 308(6921), p. 107.

- doi: 10.1136/bmj.308.6921.107.
- Andersson, R. E. and Lambe, M. (2001) 'Incidence of appendicitis during pregnancy', *International Journal of Epidemiology*, 30(6), pp. 1281–1285. doi: 10.1093/ije/30.6.1281.
- Andersson, R. E. and Petzold, M. G. (2007) 'Nonsurgical treatment of appendiceal abscess or phlegmon: A systematic review and meta-analysis', *Annals of Surgery*, 246(5), pp. 741–748. doi: 10.1097/SLA.0b013e31811f3f9f.
- Andreou, P., Blain, S. and du Boulay, C. E. H. (1990) 'A histopathological study of the appendix at autopsy and after surgical resection', *Histopathology*, 17, pp. 427–431. doi: 10.1111/j.1365-2559.1990.tb00763.x.
- Aydin, E., Türkmen, İ. U., Namli, G., Öztürk, Ç., Esen, A. B., Eray, Y. N., Eroğlu, E. and Akova, F. (2020) 'A novel and simple machine learning algorithm for preoperative diagnosis of acute appendicitis in children', *Pediatric Surgery International*, 36(6), pp. 735–742. doi: 10.1007/s00383-020-04655-7.
- Balachandran, B., Singhi, S. and Lal, S. (2013) 'Emergency Management of Acute Abdomen in Children', *The Indian Journal of Pediatrics*, 80(3), pp. 226–234. doi: 10.1007/s12098-013-0991-1.
- Balamuth, F., Alpern, E. R., Kan, M., Shumyatcher, M., Hayes, K., Lautenbach, E. and Himes, B. E. (2020) 'Gene Expression Profiles in Children With Suspected Sepsis', *Annals of Emergency Medicine*, 75(6), pp. 744–754. doi: 10.1016/j.annemergmed.2019.09.020.
- Baranova, I. N., Kurlander, R., Bocharov, A. V., Vishnyakova, T. G., Chen, Z., Remaley, A. T., Csako, G., Patterson, A. P. and Eggerman, T. L. (2008) 'Role of Human CD36 in Bacterial Recognition, Phagocytosis, and Pathogen-Induced JNK-Mediated Signaling', *The Journal of Immunology*, 181(10), pp. 7147–7156. doi: 10.4049/jimmunol.181.10.7147.
- Bates, M. F., Khandar, A., Steigman, S. A., Tracy, T. F. and Luks, F. I. (2014) 'Use of white blood cell count and negative appendectomy rate', *Pediatrics*, 133(1), pp. e39–e44. doi: 10.1542/peds.2013-2418.
- Benabbas, R., Hanna, M., Shah, J. and Sinert, R. (2017) 'Diagnostic Accuracy of History, Physical Examination, Laboratory Tests, and Point-of-care Ultrasound for Pediatric Acute Appendicitis in the Emergency Department: A Systematic Review and Meta-analysis', *Academic Emergency Medicine*, 24(5), pp. 523–551. doi: 10.1111/acem.13181.
- Berger, T., Togawa, A., Duncan, G. S., Elia, A. J., You-Ten, A., Wakeham, A., Fong, H. E. H., Cheung, C. C. and Mak, T. W. (2006) 'Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to Escherichia coli infection but not to ischemia-reperfusion injury', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(6), pp. 1834–1839. doi: 10.1073/pnas.0510847103.
- Bettelli, E., Oukka, M. and Kuchroo, V. K. (2007) 'TH-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity', *Nature Immunology*, 8(4), pp. 345–350. doi: 10.1038/ni0407-345.

- Bhangu, A., Søreide, K., Di Saverio, S., Assarsson, J. H. and Drake, F. T. (2015) 'Acute appendicitis: Modern understanding of pathogenesis, diagnosis, and management', *The Lancet*, 386(10000), pp. 1278–1287. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00275-5.
- Bishop, G. A., Moore, C. R., Xie, P., Stunz, L. L. and Kraus, Z. J. (2007) 'TRAF Proteins in CD40 Signaling', in Wu, H. (ed.) *TNF Receptor Associated Factors (TRAFs)*. New York, NY: Springer New York, pp. 131–151. doi: 10.1007/978-0-387-70630-6\_11.
- Blander, J. M. and Sander, L. E. (2012) 'Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat', *Nature Reviews Immunology*, 12(3), pp. 215–225. doi: 10.1038/nri3167.
- Bolstad, B. M., Irizarry, R. A., Åstrand, M. and Speed, T. P. (2003) 'A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias', *Bioinformatics*, 19(2), pp. 185–193. doi: 10.1093/bioinformatics/19.2.185.
- Bröker, M. E. E., van Lieshout, E. M. M., van der Elst, M., Stassen, L. P. S. and Schepers, T. (2012) 'Discriminating Between Simple and Perforated Appendicitis', *Journal of Surgical Research*, 176(1), pp. 79–83. doi: 10.1016/j.jss.2011.09.049.
- Bundy, D. G., Byerley, J. S., Liles, E. A., Perrin, E. M., Katznelson, J. and Rice, H. E. (2007) 'Does this child have appendicitis?', *Journal of the American Medical Association*. American Medical Association, 298(4), pp. 438–451. doi: 10.1001/jama.298.4.438.
- Caperell, K., Pitetti, R. and Cross, K. P. (2013) 'Race and Acute Abdominal Pain in a Pediatric Emergency Department', *Pediatrics*, 131(6), pp. 1098–1106. doi: 10.1542/peds.2012-3672.
- Carr, N. J. (2000) 'The pathology of acute appendicitis', *Annals of Diagnostic Pathology*, 4(1), pp. 46–58. doi: 10.1016/s1092-9134(00)90011-x.
- Chang., A. R. (1981) 'An Analysis of the pathology of 3003 Appendices', *ANZ Journal of Surgery*, 51(2), pp. 169–178. doi: 10.1111/j.1445-2197.1981.tb05932.x.
- Chawla, L. S., Toma, I., Davison, D., Vaziri, K., Lee, J., Lucas, R., Seneff, M. G., Nyhan, A. and McCaffrey, T. A. (2016) 'Acute appendicitis: transcript profiling of blood identifies promising biomarkers and potential underlying processes', *BMC Medical Genomics*. BMC Medical Genomics, 9(1), p. 40. doi: 10.1186/s12920-016-0200-y.
- Chen, Z., Laurence, A., Kanno, Y., Pacher-Zavisin, M., Zhu, B.-M., Tato, C., Yoshimura, A., Hennighausen, L. and O'Shea, J. J. (2006) 'Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(21), pp. 8137–8142. doi: 10.1073/pnas.0600666103.
- Chiu, Y.-H., MacMillan, J. B. and Chen, Z. J. (2009) 'RNA Polymerase III Detects Cytosolic DNA and Induces Type I Interferons through the RIG-I Pathway', *Cell*, 138(3), pp. 576–591. doi: 10.1016/j.cell.2009.06.015.
- Chu, P. G. and Arber, D. A. (2001) 'CD79: A Review', *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 9(2), pp. 97–106. doi: 10.1097/00129039-200106000-00001.

- Clevers, H., Alarcon, B., Wileman, T. and Terhorst, C. (1988) 'The T Cell Receptor/CD3 Complex: A Dynamic Protein Ensemble', *Annual Review of Immunology*, 6(1), pp. 629–662. doi: 10.1146/annurev.iy.06.040188.003213.
- Cobben, L. P., De Mol Van Otterloo, A. and Puylaert, J. B. C. M. (2000) 'Spontaneously resolving appendicitis: Frequency and natural history in 60 patients', *Radiology*, 215(2), pp. 349–352. doi: 10.1148/radiology.215.2.r00ma08349.
- Colvin, J. M., Bachur, R. and Kharbanda, A. (2007) 'The Presentation of Appendicitis in Preadolescent Children', *Pediatric Emergency Care*, 23(12), pp. 849–855. doi: 10.1097/pec.0b013e31815c9d7f.
- Coorens, M., Rao, A., Gräfe, S. K., Unelius, D., Lindforss, U., Agerberth, B., Mjösberg, J. and Bergman, P. (2019) 'Innate lymphoid cell type 3–derived interleukin-22 boosts lipocalin-2 production in intestinal epithelial cells via synergy between STAT3 and NF- $\kappa$ B', *Journal of Biological Chemistry*, 294(15), pp. 6027–6041. doi: 10.1074/jbc.RA118.007290.
- Cornell, T. T., Wynn, J., Shanley, T. P., Wheeler, D. S. and Wong, H. R. (2010) 'Mechanisms and Regulation of the Gene-Expression Response to Sepsis', *PEDIATRICS*, 125(6), pp. 1248–1258. doi: 10.1542/peds.2009-3274.
- Courtney, A. H., Lo, W.-L. and Weiss, A. (2018) 'TCR Signaling: Mechanisms of Initiation and Propagation', *Trends in Biochemical Sciences*, 43(2), pp. 108–123. doi: 10.1016/j.tibs.2017.11.008.
- Cua, D. J. and Tato, C. M. (2010) 'Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system', *Nature Reviews Immunology*, 10(7), pp. 479–489. doi: 10.1038/nri2800.
- Cuadrado, A. and Nebreda, A. R. (2010) 'Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling', *Biochemical Journal*, 429(3), pp. 403–417. doi: 10.1042/BJ20100323.
- Deaver, J. B. (1905) *Appendicitis*. 3rd ed. Philadelphia: P. Blakiston's Son & Co.
- Deng, Y., Chang, D. C., Zhang, Y., Webb, J., Gabre-Kidan, A. and Abdullah, F. (2010) 'Seasonal and day of the week variations of perforated appendicitis in US children', *Pediatric Surgery International*, 26(7), pp. 691–696. doi: 10.1007/s00383-010-2628-z.
- Dillman, J. R., Trout, A. T. and Davenport, M. S. (2018) 'Allergic-like contrast media reaction management in children', *Pediatric Radiology*, 48(12), pp. 1688–1694. doi: 10.1007/s00247-018-4241-6.
- Dudkina, N. V., Spicer, B. A., Reboul, C. F., Conroy, P. J., Lukyanova, N., Elmlund, H., Law, R. H. P., Ekkel, S. M., Kondos, S. C., Goode, R. J. A., Ramm, G., Whisstock, J. C., Saibil, H. R. and Dunstone, M. A. (2016) 'Structure of the poly-C9 component of the complement membrane attack complex', *Nature Communications*, 7(1), p. 10588. doi: 10.1038/ncomms10588.
- Dunkelberger, J. R. and Song, W.-C. (2010) 'Complement and its role in innate and adaptive immune responses', *Cell Research*, 20(1), pp. 34–50. doi: 10.1038/cr.2009.139.

- Elgueta, R., Benson, M. J., de Vries, V. C., Wasiuk, A., Guo, Y. and Noelle, R. J. (2009) 'Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system', *Immunological Reviews*, 229(1), pp. 152–172. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x.
- Escribá, A., Gamell, A. M., Fernández, Y., Quintillá, J. M. and Cubells, C. L. (2011) 'Prospective Validation of Two Systems of Classification for the Diagnosis of Acute Appendicitis', *Pediatric Emergency Care*, 27(3), pp. 165–169. doi: 10.1097/PEC.0b013e31820d6460.
- Fallon, S. C., Kim, M. E., Hallmark, C. A., Carpenter, J. L., Eldin, K. W., Lopez, M. E., Wesson, D. E., Brandt, M. L. and Ruben Rodriguez, J. (2015) 'Correlating surgical and pathological diagnoses in pediatric appendicitis', *Journal of Pediatric Surgery*. Elsevier Inc., 50(4), pp. 638–641. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2014.11.001.
- Fares, A. (2014) 'Summer appendicitis', *Annals of Medical and Health Sciences Research*, 4(1), p. 18. doi: 10.4103/2141-9248.126603.
- Fellmann, M., Buschor, P., Röthlisberger, S., Zellweger, F. and Vogel, M. (2015) 'High affinity targeting of CD23 inhibits IgE synthesis in human B cells', *Immunity, Inflammation and Disease*. John Wiley and Sons Inc., 3(4), pp. 339–349. doi: 10.1002/iid3.72.
- Fernandes, M. J. G., Rollet-Labelle, E., Paré, G., Marois, S., Tremblay, M.-L., Teillaud, J.-L. and Naccache, P. H. (2006) 'CD16b associates with high-density, detergent-resistant membranes in human neutrophils', *Biochemical Journal*, 393(1), pp. 351–359. doi: 10.1042/BJ20050129.
- Fitz Reginald H. (1886) *Perforating inflammation of the vermiform appendix: with special reference to its early diagnosis and treatment*, Philadelphia : Wm. J. Dornan, printer.
- Flierl, M. A., Rittirsch, D., Gao, H., Hoesel, L. M., Nadeau, B. A., Day, D. E., Zetoune, F. S., Sarma, J. V., Huber-Lang, M. S., Ferrara, J. L. M. and Ward, P. A. (2008) 'Adverse functions of IL-17A in experimental sepsis', *The FASEB Journal*, 22(7), pp. 2198–2205. doi: 10.1096/fj.07-105221.
- Frisch, M. and Gridley, G. (2002) 'Appendectomy in Adulthood and the Risk of Inflammatory Bowel Diseases', *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 37(10), pp. 1175–1177. doi: 10.1080/003655202760373380.
- Frisch, M., Pedersen, B. V. and Andersson, R. E. (2009) 'Appendicitis, mesenteric lymphadenitis, and subsequent risk of ulcerative colitis: cohort studies in Sweden and Denmark', *BMJ*, 338(mar09 2), pp. b716–b716. doi: 10.1136/bmj.b716.
- Geering, B., Stoeckle, C., Conus, S. and Simon, H.-U. (2013) 'Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils', *Trends in Immunology*, 34(8), pp. 398–409. doi: 10.1016/j.it.2013.04.002.
- Gesellschaft für Pädiatrische Radiologie (2020) *Bauchschmerz bei Kindern - Bildgebende Diagnostik*, [www.awmf.org](https://www.awmf.org). Available at: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/064-016l\\_S1\\_Bauchschmerz\\_Kinder\\_2020-07.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/064-016l_S1_Bauchschmerz_Kinder_2020-07.pdf) (Accessed: 11 December 2020).
- Ghimire, L., Paudel, S., Jin, L. and Jeyaseelan, S. (2020) 'The NLRP6 inflammasome in health

- and disease', *Mucosal Immunology*, 13(3), pp. 388–398. doi: 10.1038/s41385-020-0256-z.
- Giannis, D., Matenoglou, E. and Moris, D. (2020) 'Hyponatremia as a marker of complicated appendicitis: A systematic review', *The Surgeon*, 18(5), pp. 295–304. doi: 10.1016/j.surge.2020.01.002.
- Goldman, R. D., Carter, S., Stephens, D., Antoon, R., Mounstephen, W. and Langer, J. C. (2008) 'Prospective Validation of the Pediatric Appendicitis Score', *The Journal of Pediatrics*, 153(2), pp. 278–282. doi: 10.1016/j.jpeds.2008.01.033.
- Gorter, R. R., van den Boom, A. L., Heij, H. A., Kneepkens, C. M. F., Hulsker, C. C., Tenhagen, M., Dawson, I. and van der Lee, J. H. (2016) 'A scoring system to predict the severity of appendicitis in children', *Journal of Surgical Research*, 200(2), pp. 452–459. doi: 10.1016/j.jss.2015.08.042.
- Graffeo, C. S. and Counselman, F. L. (1996) 'APPENDICITIS', *Emergency Medicine Clinics of North America*, 14(4), pp. 653–671. doi: 10.1016/S0733-8627(05)70273-X.
- Grynspan, D. and Rabah, R. (2008) 'Adenoviral Appendicitis Presenting Clinically as Acute Appendicitis', *Pediatric and Developmental Pathology*. SAGE Publications Inc, 11(2), pp. 138–141. doi: 10.2350/07-06-0299.1.
- Guarner, J., Leon-Bojorge, B. de, Lopez-Corella, E., Ferebee-Harris, T., Gooding, L., Garnett, C. T., Shieh, W.-J., Dawson, J., Erdman, D. and Zaki, MD, PhD, S. R. (2003) 'Intestinal Intussusception Associated With Adenovirus Infection in Mexican Children', *American Journal of Clinical Pathology*, 120(6), pp. 845–850. doi: 10.1309/LBRN-GF9M-JW2M-HT97.
- Hajibandeh, Shahab, Hajibandeh, Shahin, Hobbs, N. and Mansour, M. (2020) 'Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts acute appendicitis and distinguishes between complicated and uncomplicated appendicitis: A systematic review and meta-analysis', *The American Journal of Surgery*, 219(1), pp. 154–163. doi: 10.1016/j.amjsurg.2019.04.018.
- Hall, N. J. and Eaton, S. (2018) 'Non-operative management of appendicitis in children', *Archives of Disease in Childhood*, 103(5), pp. 498–502. doi: 10.1136/archdischild-2017-313267.
- Hall, N. J., Eaton, S., Abbo, O., Arnaud, A. P., Beaudin, M., Brindle, M., Bütter, A., Davies, D., Jancelewicz, T., Johnson, K., Keijzer, R., Lapidus-Krol, E., Offringa, M., Piché, N., Rintala, R., Skarsgard, E., Svensson, J. F., Ungar, W. J., Wester, T., Willan, A. R., Zani, A., St Peter, S. D. and Pierro, A. (2017) 'Appendectomy versus non-operative treatment for acute uncomplicated appendicitis in children: study protocol for a multicentre, open-label, non-inferiority, randomised controlled trial', *BMJ Paediatrics Open*. BMJ Publishing Group, 1(1), p. bmjpo-2017-000028. doi: 10.1136/bmjpo-2017-000028.
- Halls, M. L. and Cooper, D. M. F. (2017) 'Adenylyl cyclase signalling complexes – Pharmacological challenges and opportunities', *Pharmacology & Therapeutics*, 172, pp. 171–180. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.01.001.
- Hansson, J., Körner, U., Khorram-Manesh, A., Solberg, A. and Lundholm, K. (2009) 'Randomized

- clinical trial of antibiotic therapy versus appendicectomy as primary treatment of acute appendicitis in unselected patients', *British Journal of Surgery*, 96(5), pp. 473–481. doi: 10.1002/bjs.6482.
- Hänzelmann, S., Wang, J., Güney, E., Tang, Y., Zhang, E., Axelsson, A. S., Nenonen, H., Salehi, A. S., Wollheim, C. B., Zetterberg, E., Berntorp, E., Costa, I. G., Castelo, R. and Rosengren, A. H. (2015) 'Thrombin stimulates insulin secretion via protease-activated receptor-3', *Islets*. Taylor & Francis, 7(4), p. e1118195. doi: 10.1080/19382014.2015.1118195.
- Hardy, I. R., Anceriz, N., Rousseau, F., Seefeldt, M. B., Hatterer, E., Irla, M., Buatois, V., Chatel, L. E., Getahun, A., Fletcher, A., Cons, L., Pontini, G., Hertzberg, N. A., Magistrelli, G., Malinge, P., Smith, M. J., Reith, W., Kosco-Vilbois, M. H., Ferlin, W. G. and Cambier, J. C. (2014) 'Anti-CD79 Antibody Induces B Cell Anergy That Protects against Autoimmunity', *The Journal of Immunology*, 192(4), pp. 1641–1650. doi: 10.4049/jimmunol.1302672.
- Hartwich, J., Luks, F. I., Watson-Smith, D., Kurkchubasche, A. G., Muratore, C. S., Wills, H. E. and Tracy, T. F. (2016) 'Nonoperative treatment of acute appendicitis in children: A feasibility study', *Journal of Pediatric Surgery*. Elsevier Inc., 51(1), pp. 111–116. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2015.10.024.
- Hò, G.-G. T., Heinen, F. J., Blasczyk, R., Pich, A. and Bade-Doeding, C. (2019) 'HLA-F Allele-Specific Peptide Restriction Represents an Exceptional Proteomic Footprint', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), p. 5572. doi: 10.3390/ijms20225572.
- Horst, P. D. med. D. (2021) *Einsenderinformation Institut für Pathologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Charité – Universitätsmedizin Berlin*. Available at: [https://pathologie-ccm.charite.de/diagnostik/informationen\\_fuer\\_einsender/](https://pathologie-ccm.charite.de/diagnostik/informationen_fuer_einsender/) (Accessed: 12 January 2021).
- Hubbe, M. and Altevogt, P. (1994) 'Heat-stable antigen/CD24 on mouse T lymphocytes: evidence for a costimulatory function', *European Journal of Immunology*. John Wiley & Sons, Ltd, 24(3), pp. 731–737. doi: 10.1002/eji.1830240336.
- Imaoka, Y., Itamoto, T., Takakura, Y., Suzuki, T., Ikeda, S. and Urushihara, T. (2016) 'Validity of predictive factors of acute complicated appendicitis', *World Journal of Emergency Surgery*, 11(1), p. 48. doi: 10.1186/s13017-016-0107-0.
- Iwakura, Y., Ishigame, H., Saijo, S. and Nakae, S. (2011) 'Functional Specialization of Interleukin-17 Family Members', *Immunity*, 34(2), pp. 149–162. doi: 10.1016/j.immuni.2011.02.012.
- Jaschinski, T., Mosch, C. G., Eikermann, M., Neugebauer, E. A. and Sauerland, S. (2018) 'Laparoscopic versus open surgery for suspected appendicitis', *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd, 11(11), p. CD001546. doi: 10.1002/14651858.CD001546.pub4.
- Jin, B., Shen, H., Lin, S., Li, J.-L., Chen, Z., Griffin, J. D. and Wu, L. (2010) 'The Mastermind-like 1 (MAML1) Co-activator Regulates Constitutive NF-κB Signaling and Cell Survival', *Journal of*

- Biological Chemistry*. 2010/03/15. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 285(19), pp. 14356–14365. doi: 10.1074/jbc.M109.078865.
- Jung, S. K., Rhee, D. Y., Lee, W. J., Woo, S. H., Seol, S. H., Kim, D. H. and Choi, S. P. (2017) 'Neutrophil-to-lymphocyte count ratio is associated with perforated appendicitis in elderly patients of emergency department', *Aging Clinical and Experimental Research*. Springer International Publishing, 29(3), pp. 529–536. doi: 10.1007/s40520-016-0584-8.
- Kaplan, G. G., Pedersen, B. V., Andersson, R. E., Sands, B. E., Korzenik, J. and Frisch, M. (2007) 'The risk of developing Crohn's disease after an appendectomy: a population-based cohort study in Sweden and Denmark', *Gut*, 56(10), pp. 1387–1392. doi: 10.1136/gut.2007.121467.
- Kazi, J. U. and Rönstrand, L. (2019) 'FMS-like Tyrosine Kinase 3/FLT3: From Basic Science to Clinical Implications', *Physiological Reviews*. American Physiological Society, 99(3), pp. 1433–1466. doi: 10.1152/physrev.00029.2018.
- Khadka, B. and Gupta, R. S. (2019) 'Novel Molecular Signatures in the PIP4K/PIP5K Family of Proteins Specific for Different Isozymes and Subfamilies Provide Important Insights into the Evolutionary Divergence of this Protein Family', *Genes*. MDPI, 10(4), p. 312. doi: 10.3390/genes10040312.
- Kharbanda, A. B., Stevenson, M. D., Macias, C. G., Sinclair, K., Dudley, N. C., Bennett, J., Bajaj, L., Mittal, M. K., Huang, C., Bachur, R. G. and Dayan, P. S. (2012) 'Interrater Reliability of Clinical Findings in Children With Possible Appendicitis', *Pediatrics*, 129(4), pp. 695–700. doi: 10.1542/peds.2011-2037.
- Kim, K., Kim, Y. H., Kim, S. Y., Kim, S., Lee, Y. J., Kim, K. P., Lee, H. S., Ahn, S., Kim, T., Hwang, S., Song, K. J., Kang, S.-B., Kim, D.-W., Park, S. H. and Lee, K. H. (2012) 'Low-Dose Abdominal CT for Evaluating Suspected Appendicitis', *New England Journal of Medicine*, 366(17), pp. 1596–1605. doi: 10.1056/NEJMoa1110734.
- Kim, M. S., Park, H. W., Park, J. Y., Park, H.-J., Lee, S.-Y., Hong, H. P., Kwag, H. J. and Kwon, H.-J. (2014) 'Differentiation of early perforated from nonperforated appendicitis: MDCT findings, MDCT diagnostic performance, and clinical outcome', *Abdominal Imaging*, 39(3), pp. 459–466. doi: 10.1007/s00261-014-0117-x.
- Kiss, N., Minderjahn, M., Reismann, J., Svensson, J., Wester, T., Hauptmann, K., Schad, M., Kallarackal, J., von Bernuth, H. and Reismann, M. (2021) 'Use of gene expression profiling to identify candidate genes for pretherapeutic patient classification in acute appendicitis', *BJS Open*, 5(1). doi: 10.1093/bjsopen/zraa045.
- Knaapen, M., Van der Lee, J. H., Gaillard, E. L., Cense, H. A., in 't Hof, K. H., Kneepkens, C. M. F., Wijnen, M. H., Heij, H. A., Bakx, R., van Heurn, L. W. E. and Gorter, R. R. (2021) 'Non-operative treatment of children with simple appendicitis: long-term follow-up (5 years) in a prospective cohort study', *British Journal of Surgery*. doi: 10.1093/bjs/znaa052.
- Kooij, I. A., Sahami, S., Meijer, S. L., Buskens, C. J. and te Velde, A. A. (2016) 'The immunology

- of the vermiform appendix: a review of the literature', *Clinical & Experimental Immunology*, 186(1), pp. 1–9. doi: 10.1111/cei.12821.
- Lamps, L. W. (2010) 'Infectious Causes of Appendicitis', *Infectious Disease Clinics of North America*, 24(4), pp. 995–1018. doi: 10.1016/j.idc.2010.07.012.
- Laurin, M., Everett, M. Lou and Parker, W. (2011) 'The Cecal Appendix: One More Immune Component With a Function Disturbed By Post-Industrial Culture', *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 294(4), pp. 567–579. doi: 10.1002/ar.21357.
- Lee, J.-U., Kim, L.-K. and Choi, J.-M. (2018) 'Revisiting the Concept of Targeting NFAT to Control T Cell Immunity and Autoimmune Diseases', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 9, p. 2747. doi: 10.3389/fimmu.2018.02747.
- Lee, S. L., Islam, S., Cassidy, L. D., Abdullah, F. and Arca, M. J. (2010) 'Antibiotics and appendicitis in the pediatric population: an American Pediatric Surgical Association Outcomes and Clinical Trials Committee Systematic Review', *Journal of Pediatric Surgery*. Elsevier Inc., 45(11), pp. 2181–2185. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2010.06.038.
- Li, J., Zhang, Y., Lou, J., Zhu, J., He, M., Deng, X. and Cai, Z. (2012) 'Neutralisation of Peritoneal IL-17A Markedly Improves the Prognosis of Severe Septic Mice by Decreasing Neutrophil Infiltration and Proinflammatory Cytokines', *PLoS ONE*. Edited by B. Ryffel. Public Library of Science, 7(10), p. e46506. doi: 10.1371/journal.pone.0046506.
- Li, X., Bu, X., Lu, B., Avraham, H., Flavell, R. A. and Lim, B. (2002) 'The Hematopoiesis-Specific GTP-Binding Protein RhoH Is GTPase Deficient and Modulates Activities of Other Rho GTPases by an Inhibitory Function', *Molecular and Cellular Biology*. American Society for Microbiology, 22(4), pp. 1158–1171. doi: 10.1128/MCB.22.4.1158-1171.2002.
- Lin, S.-C., Lo, Y.-C. and Wu, H. (2010) 'Helical assembly in the MyD88–IRAK4–IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling', *Nature*, 465(7300), pp. 885–890. doi: 10.1038/nature09121.
- Lippert, H. (2006) *Lehrbuch Anatomie : 184 Tabellen. 7., erw. A, Anatomie. 7., erw. A. München u.a. : Elsevier, Urban & Fischer.*
- Litz, C. N., Asuncion, J. B., Danielson, P. D. and Chandler, N. M. (2018) 'Timing of antimicrobial prophylaxis and infectious complications in pediatric patients undergoing appendectomy', *Journal of Pediatric Surgery*, 53(3), pp. 449–451. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2017.05.005.
- Liu, Y., Jones, B., Aruffo, A., Sullivan, K. M., Linsley, P. S. and Janeway, C. A. (1992) 'Heat-stable antigen is a costimulatory molecule for CD4 T cell growth.', *Journal of Experimental Medicine*. The Rockefeller University Press, 175(2), pp. 437–445. doi: 10.1084/jem.175.2.437.
- Livingston, E. H., Woodward, W. A., Sarosi, G. A. and Haley, R. W. (2007) 'Disconnect Between Incidence of Nonperforated and Perforated Appendicitis', *Annals of Surgery*, 245(6), pp. 886–892. doi: 10.1097/01.sla.0000256391.05233.aa.
- Llullaku, S. S., Hyseni, N. S., Kelmendi, B. Z., Jashari, H. J. and Hasani, A. S. (2010) 'A pin in

- appendix within Amyand's hernia in a six-years-old boy: case report and review of literature', *World Journal of Emergency Surgery*. BioMed Central, 5(1), p. 14. doi: 10.1186/1749-7922-5-14.
- Löffler, G. (2008a) 'Proteinbiosynthese und Proteinmodifikation', in Löffler, G. (ed.) *Basiswissen Biochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 265–283. doi: 10.1007/978-3-540-76512-7\_14.
- Löffler, G. (2008b) 'RNA und Genexpression', in Löffler, G. (ed.) *Basiswissen Biochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 243–263. doi: 10.1007/978-3-540-76512-7\_13.
- Loghmani, H. and Conway, E. M. (2018) 'Exploring traditional and nontraditional roles for thrombomodulin', *Blood*, 132(2), pp. 148–158. doi: 10.1182/blood-2017-12-768994.
- Luo, W. and Brouwer, C. (2013) 'Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization', *Bioinformatics*, 29(14), pp. 1830–1831. doi: 10.1093/bioinformatics/btt285.
- Luo, W., Friedman, M. S., Shedden, K., Hankenson, K. D. and Woolf, P. J. (2009) 'GAGE: generally applicable gene set enrichment for pathway analysis', *BMC Bioinformatics*, 10(1), p. 161. doi: 10.1186/1471-2105-10-161.
- Malech, H. L., DeLeo, F. R. and Quinn, M. T. (2020) 'The Role of Neutrophils in the Immune System: An Overview', in Quinn, M. T. and DeLeo, F. R. (eds) *Neutrophil: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer US, pp. 3–10. doi: 10.1007/978-1-0716-0154-9\_1.
- Maltezou, H., Nikolaidis, P., Lebesii, E., Dimitriou, L., Androulakakis, E. and Kafetzis, D. (2001) 'Piperacillin/Tazobactam Versus Cefotaxime Plus Metronidazole for Treatment of Children with Intra-Abdominal Infections Requiring Surgery', *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(9), pp. 643–646. doi: 10.1007/s100960100581.
- Man, S. M., Hopkins, L. J., Nugent, E., Cox, S., Gluck, I. M., Turlomousis, P., Wright, J. A., Cicuta, P., Monie, T. P. and Bryant, C. E. (2014) 'Inflammasome activation causes dual recruitment of NLRC4 and NLRP3 to the same macromolecular complex', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(20), pp. 7403–7408. doi: 10.1073/pnas.1402911111.
- Matsui, H., Harada, I. and Sawada, Y. (2012) 'Src, p130Cas, and Mechanotransduction in Cancer Cells', *Genes & Cancer*. SAGE Publications, 3(5–6), pp. 394–401. doi: 10.1177/1947601912461443.
- Matsumoto, M., Yamada, T., Yoshinaga, S. K., Boone, T., Horan, T., Fujita, S., Li, Y. and Mitani, T. (2002) 'Essential Role of NF- $\kappa$ B-Inducing Kinase in T Cell Activation Through the TCR/CD3 Pathway', *The Journal of Immunology*, 169(3), pp. 1151–1158. doi: 10.4049/jimmunol.169.3.1151.
- McBurney, C. (1894) 'The incision made in the abdominal wall in cases of appendicitis, with a description of a new method of operating', *Annals of Surgery*, 20(1), pp. 38–43. doi: 10.1097/00000658-189407000-00004.

- Mcmurrich., J. P. (1931) 'Leonardo da Vinci, the Anatomist (1452–1519)', *British Journal of Surgery*. John Wiley & Sons, Ltd, 18(72), pp. 680–681. doi: 10.1002/bjs.1800187226.
- Minderjahn, M. I., Schädlich, D., Radtke, J., Rothe, K. and Reismann, M. (2018) 'Phlegmonous appendicitis in children is characterized by eosinophilia in white blood cell counts', *World Journal of Pediatrics*, 14(5), pp. 504–509. doi: 10.1007/s12519-018-0173-3.
- Muller, S., Falch, C., Axt, S., Wilhelm, P., Hein, D., Königsrainer, A. and Kirschniak, A. (2015) 'Diagnostic accuracy of hyperbilirubinaemia in anticipating appendicitis and its severity', *Emergency Medicine Journal*, 32(9), pp. 698–702. doi: 10.1136/emered-2013-203349.
- Munitz, A., Cole, E. T., Beichler, A., Groschwitz, K., Ahrens, R., Steinbrecher, K., Willson, T., Han, X., Denson, L., Rothenberg, M. E. and Hogan, S. P. (2010) 'Paired Immunoglobulin-Like Receptor B (PIR-B) Negatively Regulates Macrophage Activation in Experimental Colitis', *Gastroenterology*. 2010/04/14, 139(2), pp. 530–541. doi: 10.1053/j.gastro.2010.04.006.
- Murakami, M., Nakatani, Y., Atsumi, G., Inoue, K. and Kudo, I. (2017) 'Regulatory Functions of Phospholipase A2', *Critical Reviews in Immunology*, 37(2–6), pp. 121–179. doi: 10.1615/CritRevImmunol.v37.i2-6.20.
- Murphy, C. G., Glickman, J. N., Tomczak, K., Wang, Y. Y., Beggs, A. H., Shannon, M. W. and Horwitz, B. H. (2008) 'Acute appendicitis is characterized by a uniform and highly selective pattern of inflammatory gene expression', *Mucosal Immunology*, 1(4), pp. 297–308. doi: 10.1038/mi.2008.13.
- Murphy, K. and Weaver, C. (2018) *Janeway Immunologie*. 9. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Nadler, E. P., Reblock, K. K., Vaughan, K. G., Meza, M. P., Ford, H. R. and Gaines, B. A. (2004) 'Predictors of Outcome for Children with Perforated Appendicitis Initially Treated with Non-Operative Management', *Surgical Infections*, 5(4), pp. 349–356. doi: 10.1089/sur.2004.5.349.
- O'Hare, F. M., Watson, W., O'Neill, A., Grant, T., Onwuneme, C., Donoghue, V., Mooney, E., Downey, P., Murphy, J., Twomey, A. and Molloy, E. J. (2015) 'Neutrophil and monocyte toll-like receptor 4, CD11b and reactive oxygen intermediates, and neuroimaging outcomes in preterm infants', *Pediatric Research*, 78(1), pp. 82–90. doi: 10.1038/pr.2015.66.
- Ohle, R., O'Reilly, F., O'Brien, K. K., Fahey, T. and Dimitrov, B. D. (2011) 'The Alvarado score for predicting acute appendicitis: a systematic review', *BMC Medicine*, 9(1), p. 139. doi: 10.1186/1741-7015-9-139.
- Ozen, A., Comrie, W. A., Ardy, R. C., Domínguez Conde, C., Dalgic, B., Beser, Ö. F., Morawski, A. R., Karakoc-Aydiner, E., Tutar, E., Baris, S., Ozcay, F., Serwas, N. K., Zhang, Y., Matthews, H. F., Pittaluga, S., Folio, L. R., Unlusoy Aksu, A., McElwee, J. J., Krolo, A., Kiykim, A., Baris, Z., Gulsan, M., Ogulur, I., Snapper, S. B., Houwen, R. H. J., Leavis, H. L., Ertem, D., Kain, R., Sari, S., Erkan, T., Su, H. C., Boztug, K. and Lenardo, M. J. (2017) 'CD55 Deficiency, Early-Onset Protein-Losing Enteropathy, and Thrombosis', *New England Journal of Medicine*.

- Massachusetts Medical Society, 377(1), pp. 52–61. doi: 10.1056/NEJMoa1615887.
- Park, H. C., Kim, M. J. and Lee, B. H. (2017) 'Randomized clinical trial of antibiotic therapy for uncomplicated appendicitis', *British Journal of Surgery*. John Wiley & Sons, Ltd, 104(13), pp. 1785–1790. doi: 10.1002/bjs.10660.
- Parkinson, J. (1812) 'Case of diseased Appendix Vermiformis.', *Medico-chirurgical transactions*, 3, pp. 57–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20895178>.
- Patkova, B., Svenningsson, A., Almström, M., Eaton, S., Wester, T. and Svensson, J. F. (2020) 'Nonoperative Treatment Versus Appendectomy for Acute Nonperforated Appendicitis in Children', *Annals of Surgery*, 271(6), pp. 1030–1035. doi: 10.1097/SLA.0000000000003646.
- St. Peter, S. D., Sharp, S. W., Holcomb, G. W. and Ostlie, D. J. (2008) 'An evidence-based definition for perforated appendicitis derived from a prospective randomized trial', *Journal of Pediatric Surgery*, 43(12), pp. 2242–2245. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2008.08.051.
- St. Peter, S. D., Tsao, K., Spilde, T. L., Holcomb, G. W., Sharp, S. W., Murphy, J. P., Snyder, C. L., Sharp, R. J., Andrews, W. S. and Ostlie, D. J. (2008) 'Single daily dosing ceftriaxone and metronidazole vs standard triple antibiotic regimen for perforated appendicitis in children: a prospective randomized trial', *Journal of Pediatric Surgery*, 43(6), pp. 981–985. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2008.02.018.
- Picard, C., Casanova, J.-L. and Puel, A. (2011) 'Infectious Diseases in Patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or I B Deficiency', *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology, 24(3), pp. 490–497. doi: 10.1128/CMR.00001-11.
- Pieper, R., Kager, L. and Tidefeldt, U. (1982) 'Obstruction of appendix vermiformis causing acute appendicitis. An experimental study in the rabbit.', *Acta chirurgica Scandinavica*, 148(1), pp. 63–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7136413>.
- Platon, A., Jlassi, H., Rutschmann, O. T., Becker, C. D., Verdun, F. R., Gervaz, P. and Poletti, P.-A. (2009) 'Evaluation of a low-dose CT protocol with oral contrast for assessment of acute appendicitis', *European Radiology*, 19(2), pp. 446–454. doi: 10.1007/s00330-008-1164-x.
- Pogorelić, Z., Rak, S., Mrklič, I. and Jurić, I. (2015) 'Prospective Validation of Alvarado Score and Pediatric Appendicitis Score for the Diagnosis of Acute Appendicitis in Children', *Pediatric Emergency Care*, 31(3), pp. 164–168. doi: 10.1097/PEC.0000000000000375.
- Prystowsky, J. B., Pugh, C. M. and Nagle, A. P. (2005) 'Appendicitis', *Current Problems in Surgery*, 42(10), pp. 694–742. doi: 10.1067/j.cpsurg.2005.07.005.
- Quackenbush, J. (2006) 'Microarray Analysis and Tumor Classification', *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society, 354(23), pp. 2463–2472. doi: 10.1056/NEJMra042342.
- Radford-Smith, G. L. (2002) 'Protective role of appendectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease', *Gut*, 51(6), pp. 808–813. doi: 10.1136/gut.51.6.808.
- 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. doi: 10.1016/j.jtbi.2007.08.032.
- Rautava, L., Rautava, P., Sipilä, J. and Kytö, V. (2018) 'Occurrence and Treatment of Pediatric Appendicitis in Finland 2004-2014', *Journal of Surgical Research*, 232, pp. 33–38. doi: 10.1016/j.jss.2018.06.010.
- Rawolle, T., Reismann, M., Minderjahn, M. I., Bassir, C., Hauptmann, K., Rothe, K. and Reismann, J. (2019) 'Sonographic differentiation of complicated from uncomplicated appendicitis', *The British Journal of Radiology*, 92(1099), p. 20190102. doi: 10.1259/bjr.20190102.
- Reismann, J., Romualdi, A., Kiss, N., Minderjahn, M. I., Kallarackal, J., Schad, M. and Reismann, M. (2019) 'Diagnosis and classification of pediatric acute appendicitis by artificial intelligence methods: An investigator-independent approach', *PLOS ONE*. Edited by P. A. T. Baltzer, 14(9), p. e0222030. doi: 10.1371/journal.pone.0222030.
- Reismann, J., Schädlich, D., Minderjahn, M. I., Rothe, K. and Reismann, M. (2019) 'Eosinophilia in pediatric uncomplicated appendicitis is a time stable pattern', *Pediatric Surgery International*. Springer Berlin Heidelberg, 35(3), pp. 335–340. doi: 10.1007/s00383-018-4423-1.
- Rentea, R. M., Peter, S. D. St. and Snyder, C. L. (2017) 'Pediatric appendicitis: state of the art review', *Pediatric Surgery International*. Springer Berlin Heidelberg, 33(3), pp. 269–283. doi: 10.1007/s00383-016-3990-2.
- Rivera-Chavez, F. A., Peters-Hybki, D. L., Barber, R. C., Lindberg, G. M., Jialal, I., Munford, R. S. and O'Keefe, G. E. (2004) 'Innate Immunity Genes Influence the Severity of Acute Appendicitis', *Annals of Surgery*, 240(2), pp. 269–277. doi: 10.1097/01.sla.0000133184.10676.26.
- Robichaux, W. G. and Cheng, X. (2018) 'Intracellular cAMP Sensor EPAC: Physiology, Pathophysiology, and Therapeutics Development', *Physiological Reviews*. American Physiological Society, 98(2), pp. 919–1053. doi: 10.1152/physrev.00025.2017.
- Rölle, A., Halenius, A., Ewen, E.-M., Cerwenka, A., Hengel, H. and Momburg, F. (2016) 'CD2-CD58 interactions are pivotal for the activation and function of adaptive natural killer cells in human cytomegalovirus infection', *European Journal of Immunology*, 46(10), pp. 2420–2425. doi: 10.1002/eji.201646492.
- Romano, A., Parikh, P., Byers, P. and Namias, N. (2014) 'Simple Acute Appendicitis versus Non-Perforated Gangrenous Appendicitis: Is There a Difference in the Rate of Post-Operative Infectious Complications?', *Surgical Infections*, 15(5), pp. 517–520. doi: 10.1089/sur.2013.106.
- Romee, R., Foley, B., Lenvik, T., Wang, Y., Zhang, B., Ankarlo, D., Luo, X., Cooley, S., Verneris, M., Walcheck, B. and Miller, J. (2013) 'NK cell CD16 surface expression and function is

- regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17)', *Blood*. American Society of Hematology, 121(18), pp. 3599–3608. doi: 10.1182/blood-2012-04-425397.
- Romero-Pozuelo, J., Figlia, G., Kaya, O., Martin-Villalba, A. and Teleman, A. A. (2020) 'Cdk4 and Cdk6 Couple the Cell-Cycle Machinery to Cell Growth via mTORC1', *Cell Reports*, 31(2), p. 107504. doi: 10.1016/j.celrep.2020.03.068.
- Rosenbaum, D. G., Askin, G., Beneck, D. M. and Kovanlikaya, A. (2017) 'Differentiating perforated from non-perforated appendicitis on contrast-enhanced magnetic resonance imaging', *Pediatric Radiology*, 47(11), pp. 1483–1490. doi: 10.1007/s00247-017-3900-3.
- van Rossem, C. C., Schreinemacher, M. H. F., Treskes, K., van Hogezaand, R. M. and van Geloven, A. A. W. (2014) 'Duration of antibiotic treatment after appendectomy for acute complicated appendicitis', *British Journal of Surgery*, 101(6), pp. 715–719. doi: 10.1002/bjs.9481.
- Rothrock, S. G. and Pagane, J. (2000) 'Acute appendicitis in children: Emergency department diagnosis and management', *Annals of Emergency Medicine*, 36(1), pp. 39–51. doi: 10.1067/mem.2000.105658.
- Rubèr, M. (2012) *Immunopathogenic aspects of resolving and progressing appendicitis*. Linköping University Medical Dissertation.
- Rubèr, M., Andersson, M., Petersson, B. F., Olaison, G., Andersson, R. E. and Ekerfelt, C. (2010) 'Systemic Th17-like cytokine pattern in gangrenous appendicitis but not in phlegmonous appendicitis', *Surgery*. Mosby, Inc., 147(3), pp. 366–372. doi: 10.1016/j.surg.2009.09.039.
- Rubèr, M., Berg, A., Ekerfelt, C., Olaison, G. and Andersson, R. E. (2006) 'Different cytokine profiles in patients with a history of gangrenous or phlegmonous appendicitis', *Clinical and Experimental Immunology*, 143(1), pp. 117–124. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02957.x.
- Sahm, M., Koch, A., Schmidt, U., Wolff, S., Pross, M., Gastinger, I. and Lippert, H. (2012) 'Akute Appendizitis - Klinische Versorgungsforschung zur aktuellen chirurgischen Therapie', *Zentralblatt für Chirurgie - Zeitschrift für Allgemeine, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie*, 138(03), pp. 270–277. doi: 10.1055/s-0031-1283947.
- Salö, M., Ohlsson, B., Arnbjörnsson, E. and Stenström, P. (2015) 'Appendicitis in children from a gender perspective', *Pediatric Surgery International*, 31(9), pp. 845–853. doi: 10.1007/s00383-015-3729-5.
- Sand, M., Bechara, F. G., Holland-Letz, T., Sand, D., Mehnert, G. and Mann, B. (2009) 'Diagnostic value of hyperbilirubinemia as a predictive factor for appendiceal perforation in acute appendicitis', *The American Journal of Surgery*. Elsevier, 198(2), pp. 193–198. doi: 10.1016/j.amjsurg.2008.08.026.
- Schneider, R., Yaneva, T., Beauseigle, D., El-Khoury, L. and Arbour, N. (2011) 'IL-27 increases the proliferation and effector functions of human naïve CD8+ T lymphocytes and promotes their development into Tc1 cells', *European Journal of Immunology*. John Wiley & Sons, Ltd,

- 41(1), pp. 47–59. doi: 10.1002/eji.201040804.
- Schwartzberg, P. L., Finkelstein, L. D. and Readinger, J. A. (2005) 'TEC-family kinases: regulators of T-helper-cell differentiation', *Nature Reviews Immunology*, 5(4), pp. 284–295. doi: 10.1038/nri1591.
- Selvy, P. E., Lavieri, R. R., Lindsley, C. W. and Brown, H. A. (2011) 'Phospholipase D: Enzymology, Functionality, and Chemical Modulation', *Chemical Reviews*. 2011/09/22, 111(10), pp. 6064–6119. doi: 10.1021/cr200296t.
- Semenza, G. L. (2001) 'HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing', *Current Opinion in Cell Biology*, 13(2), pp. 167–171. doi: 10.1016/S0955-0674(00)00194-0.
- Seo, H., Lee, K. H., Kim, H. J., Kim, K., Kang, S.-B., Kim, S. Y. and Kim, Y. H. (2009) 'Diagnosis of Acute Appendicitis With Sliding Slab Ray-Sum Interpretation of Low-Dose Unenhanced CT and Standard-Dose IV Contrast-Enhanced CT Scans', *American Journal of Roentgenology*, 193(1), pp. 96–105. doi: 10.2214/AJR.08.1237.
- Shaulian, E. and Karin, M. (2002) 'AP-1 as a regulator of cell life and death', *Nature Cell Biology*, 4(5), pp. E131–E136. doi: 10.1038/ncb0502-e131.
- Shibata, K., Yamada, H., Hara, H., Kishihara, K. and Yoshikai, Y. (2007) 'Resident V $\delta$ 1 +  $\gamma\delta$  T Cells Control Early Infiltration of Neutrophils after Escherichia coli Infection via IL-17 Production', *The Journal of Immunology*, 178(7), pp. 4466–4472. doi: 10.4049/jimmunol.178.7.4466.
- Silverpil, E., Wright, A. K., Hansson, M., Jirholt, P., Henningsson, L., Smith, M. E., Gordon, S. B., Iwakura, Y., Gjertsson, I., Glader, P. and Lindén, A. (2013) 'Negative feedback on IL-23 exerted by IL-17A during pulmonary inflammation', *Innate Immunity*. SAGE Publications Ltd STM, 19(5), pp. 479–492. doi: 10.1177/1753425912470470.
- Simillis, C., Symeonides, P., Shorthouse, A. J. and Tekkis, P. P. (2010) 'A meta-analysis comparing conservative treatment versus acute appendectomy for complicated appendicitis (abscess or phlegmon)', *Surgery*, 147(6), pp. 818–829. doi: 10.1016/j.surg.2009.11.013.
- Skandalakis, J. E., Gray, S. W. and Ricketts, R. R. (1994) 'The Appendix, Embryology for Surgeons.', in: Baltimore: Williams & Wilkins 2nd ed, pp. 491–535.
- Smith, H. F., Fischer, R. E., Everett, M. L., Thomas, A. D., Bollinger, R. and Parker, W. (2009) 'Comparative anatomy and phylogenetic distribution of the mammalian cecal appendix', *Journal of Evolutionary Biology*, 22(10), pp. 1984–1999. doi: 10.1111/j.1420-9101.2009.01809.x.
- Smith, J. and Fox, S. M. (2016) 'Pediatric Abdominal Pain', *Emergency Medicine Clinics of North America*. Elsevier Inc, 34(2), pp. 341–361. doi: 10.1016/j.emc.2015.12.010.
- Snyder, M. J., Guthrie, M. and Cagle, S. (2018) 'Acute Appendicitis: Efficient Diagnosis and Management.', *American family physician*, pp. 25–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30215950>.

- Song, D. W., Park, B. K., Suh, S. W., Lee, S. E., Kim, J. W., Park, J.-M., Kim, H. R., Lee, M.-K., Choi, Y. S., Kim, B. G. and Park, Y. G. (2018) 'Bacterial culture and antibiotic susceptibility in patients with acute appendicitis', *International Journal of Colorectal Disease*, 33(4), pp. 441–447. doi: 10.1007/s00384-018-2992-z.
- Statistisches Bundesamt (Destatis) (2020) *Krankenhauspatienten: Deutschland, Jahre, Geschlecht, Altersgruppen, Hauptdiagnose ICD-10 (1-3-Steller Hierarchie)*, GENESIS V4.3.1.U2. Available at: <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online> (Accessed: 2 January 2021).
- Stockinger, H. (1997) 'Interaction of GPI-anchored cell surface proteins and complement receptor type 3.', *Experimental and clinical immunogenetics*, 14(1), pp. 5–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9187916>.
- Styrud, J., Eriksson, S., Nilsson, I., Ahlberg, G., Haapaniemi, S., Neovius, G., Rex, L., Badume, I. and Granström, L. (2006) 'Appendectomy versus Antibiotic Treatment in Acute Appendicitis. A Prospective Multicenter Randomized Controlled Trial', *World Journal of Surgery*, 30(6), pp. 1033–1037. doi: 10.1007/s00268-005-0304-6.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S. and Mesirov, J. P. (2005) 'Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(43), pp. 15545–15550. doi: 10.1073/pnas.0506580102.
- Sukumar, S., Conrad, D. H., Szakal, A. K. and Tew, J. G. (2006) 'Differential T Cell-Mediated Regulation of CD23 (FcεRII) in B Cells and Follicular Dendritic Cells', *The Journal of Immunology*, 176(8), pp. 4811–4817. doi: 10.4049/jimmunol.176.8.4811.
- Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X. and Chen, Z. J. (2013) 'Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway', *Science*, 339(6121), pp. 786–791. doi: 10.1126/science.1232458.
- Sutton, B. J. and Davies, A. M. (2015) 'Structure and dynamics of IgE-receptor interactions: FcεRI and CD23/FcεRII', *Immunological Reviews*, 268(1), pp. 222–235. doi: 10.1111/imr.12340.
- Svensson, J. F., Patkova, B., Almström, M., Naji, H., Hall, N. J., Eaton, S., Pierro, A. and Wester, T. (2015) 'Nonoperative Treatment With Antibiotics Versus Surgery for Acute Nonperforated Appendicitis in Children', *Annals of Surgery*, 261(1), pp. 67–71. doi: 10.1097/SLA.0000000000000835.
- Szomolanyi-Tsuda, E., Brien, J. D., Dorgan, J. E., Welsh, R. M. and Garcea, R. L. (2000) 'The Role of CD40-CD154 Interaction in Antiviral T Cell-Independent IgG Responses', *The Journal of Immunology*, 164(11), pp. 5877–5882. doi: 10.4049/jimmunol.164.11.5877.
- Tan, Y., Zhao, M., Xiang, B., Chang, C. and Lu, Q. (2016) 'CD24: from a Hematopoietic Differentiation Antigen to a Genetic Risk Factor for Multiple Autoimmune Diseases', *Clinical*

- Reviews in Allergy & Immunology*, 50(1), pp. 70–83. doi: 10.1007/s12016-015-8470-2.
- Tang, B. M. P., McLean, A. S., Dawes, I. W., Huang, S. J. and Lin, R. C. Y. (2007) 'The Use of Gene-Expression Profiling to Identify Candidate Genes in Human Sepsis', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. American Thoracic Society - AJRCCM, 176(7), pp. 676–684. doi: 10.1164/rccm.200612-1819OC.
- Tang, R., Langdon, W. Y. and Zhang, J. (2019) 'Regulation of immune responses by E3 ubiquitin ligase Cbl-b', *Cellular Immunology*. 2018/11/07, 340, p. 103878. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.11.002.
- Tseng, Y.-C., Lee, M.-S., Chang, Y.-J. and Wu, H.-P. (2008) 'Acute Abdomen in Pediatric Patients Admitted to the Pediatric Emergency Department', *Pediatrics & Neonatology*, 49(4), pp. 126–134. doi: doi: 10.1016/S1875-9572(08)60027-3.
- Turel, O., Mirapoglu, S. L., Yuksel, M., Ceylan, A. and Gultepe, B. S. (2019) 'Perforated appendicitis in children: antimicrobial susceptibility and antimicrobial stewardship', *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 16, pp. 159–161. doi: 10.1016/j.jgar.2018.09.015.
- Vanhatalo, S., Munukka, E., Sippola, S., Jalkanen, S., Grönroos, J., Marttila, H., Eerola, E., Hurme, S., Hakanen, A. J. and Salminen, P. (2019) 'Prospective multicentre cohort trial on acute appendicitis and microbiota, aetiology and effects of antimicrobial treatment: study protocol for the MAPPAC (Microbiology APPendicitis ACuta) trial', *BMJ Open*, 9(9), p. e031137. doi: 10.1136/bmjopen-2019-031137.
- Varadhan, K. K., Neal, K. R. and Lobo, D. N. (2012) 'Safety and efficacy of antibiotics compared with appendectomy for treatment of uncomplicated acute appendicitis: meta-analysis of randomised controlled trials', *BMJ*, 344(apr05 1), pp. e2156–e2156. doi: 10.1136/bmj.e2156.
- Vesalius, A. (1543) *De humani corporis fabrica Liber V*. Basileae : Ex officina Joannis Oporini, anno salutis reparatae MDLXIII [1543].
- Vons, C., Barry, C., Maitre, S., Pautrat, K., Leconte, M., Costaglioli, B., Karoui, M., Alves, A., Dousset, B., Valleur, P., Falissard, B. and Franco, D. (2011) 'Amoxicillin plus clavulanic acid versus appendectomy for treatment of acute uncomplicated appendicitis: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial', *The Lancet*, 377(9777), pp. 1573–1579. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60410-8.
- Wagner, C., Hänsch, G. M., Stegmaier, S., Deneffle, B., Hug, F. and Schoels, M. (2001) 'The complement receptor 3, CR3 (CD11b/CD18), on T lymphocytes: activation-dependent up-regulation and regulatory function', *European Journal of Immunology*. John Wiley & Sons, Ltd, 31(4), pp. 1173–1180. doi: 10.1002/1521-4141(200104)31:4<1173::AID-IMMU1173>3.0.CO;2-9.
- Wang, Q., Li, S., Tang, X., Liang, L., Wang, F. and Du, H. (2019) 'Lipocalin 2 Protects Against Escherichia coli Infection by Modulating Neutrophil and Macrophage Function', *Frontiers in Immunology*, 10, p. 2594. doi: 10.3389/fimmu.2019.02594.

- Wang, X., Li, Z.-Y., Zeng, L., Zhang, A.-Q., Pan, W., Gu, W. and Jiang, J.-X. (2015) 'Neutrophil CD64 expression as a diagnostic marker for sepsis in adult patients: a meta-analysis', *Critical Care*, 19(1), p. 245. doi: 10.1186/s13054-015-0972-z.
- Weber, T. R., Keller, M. A., Bower, R. J., Spinner, G. and Vierling, K. (2003) 'Is delayed operative treatment worth the trouble with perforated appendicitis in children?', *The American Journal of Surgery*, 186(6), pp. 685–689. doi: 10.1016/j.amjsurg.2003.08.027.
- Wieczorek, M., Abualrous, E. T., Sticht, J., Álvaro-Benito, M., Stolzenberg, S., Noé, F. and Freund, C. (2017) 'Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 8, p. 292. doi: 10.3389/fimmu.2017.00292.
- Williams, R. F., Blakely, M. L., Fischer, P. E., Streck, C. J., Dassinger, M. S., Gupta, H., Renaud, E. J., Eubanks, J. W., Huang, E. Y., Hixson, S. D. and Langham, M. R. (2009) 'Diagnosing Ruptured Appendicitis Preoperatively in Pediatric Patients', *Journal of the American College of Surgeons*, 208(5), pp. 819–825. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2009.01.029.
- Wolkomir, A., Kprnak, P., Elsakr, M. and McGovern, P. (1987) 'Seasonal Variation of Acute Appendicitis: A 56-Year Study', *Southern Medical Journal*, 80(8), pp. 958–960. doi: 10.1097/00007611-198708000-00006.
- Wong, H. R., Cvijanovich, N., Allen, G. L., Lin, R., Anas, N., Meyer, K., Freishtat, R. J., Monaco, M., Odoms, K., Sakthivel, B. and Shanley, T. P. (2009) 'Genomic expression profiling across the pediatric systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock spectrum', *Critical Care Medicine*, 37(5), pp. 1558–1566. doi: 10.1097/CCM.0b013e31819fcc08.
- Wu, H.-J. and Bondada, S. (2002) 'Positive and Negative Roles of CD72 in B Cell Function', *Immunologic Research*, 25(2), pp. 155–166. doi: 10.1385/IR:25:2:155.
- Xie, P., Kraus, Z. J., Stunz, L. L. and Bishop, G. A. (2008) 'Roles of TRAF molecules in B lymphocyte function', *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 19(3–4), pp. 199–207. doi: 10.1016/j.cytogfr.2008.04.002.
- Xu, D., Matsumoto, M. L., McKenzie, B. S. and Zarrin, A. A. (2018) 'TPL2 kinase action and control of inflammation', *Pharmacological Research*, 129, pp. 188–193. doi: 10.1016/j.phrs.2017.11.031.
- Yang, J., Liu, C., He, Y. and Cai, Z. (2019) 'Laboratory Markers in the Prediction of Acute Perforated Appendicitis in Children', *Emergency Medicine International*, 2019, pp. 1–4. doi: 10.1155/2019/4608053.
- Yardeni, D., Hirschl, R. B., Drongowski, R. A., Teitelbaum, D. H., Geiger, J. D. and Coran, A. G. (2004) 'Delayed versus immediate surgery in acute appendicitis: do we need to operate during the night?', *Journal of Pediatric Surgery*, 39(3), pp. 464–469. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2003.11.020.
- Yen, K., Karpas, A., Pinkerton, H. J. and Gorelick, M. H. (2005) 'Interexaminer Reliability in

- Physical Examination of Pediatric Patients With Abdominal Pain', *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 159(4), p. 373. doi: 10.1001/archpedi.159.4.373.
- Yu, C.-W., Juan, L.-I., Wu, M.-H., Shen, C.-J., Wu, J.-Y. and Lee, C.-C. (2013) 'Systematic review and meta-analysis of the diagnostic accuracy of procalcitonin, C-reactive protein and white blood cell count for suspected acute appendicitis', *British Journal of Surgery*, 100(3), pp. 322–329. doi: 10.1002/bjs.9008.
- Zanetti, M. (2004) 'Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity', *Journal of Leukocyte Biology*, 75(1), pp. 39–48. doi: 10.1189/jlb.0403147.
- Zhou, Q., Wu, Y., Nielsen, P. J. and Liu, Y. (1997) 'Homotypic interaction of the heat-stable antigen is not responsible for its co-stimulatory activity for T cell clonal expansion', *European Journal of Immunology*, 27(10), pp. 2524–2528. doi: 10.1002/eji.1830271009.

## 11 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Natalie Kiss, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Zur Pathophysiologie der akuten Appendizitis im Kindes- und Jugendalter – Ergebnisse einer vergleichenden prospektiven Genexpressionsuntersuchung / On the pathophysiology of acute appendicitis in children and adolescents - Results of a comparative prospective gene expression study“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Natalie Kiss hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Kiss, N., Minderjahn, M., Reismann, J., Svensson, J., Wester, T., Hauptmann, K., Schad, M., Kallarackal, J., von Bernuth, H., Reismann, M;

**Use of gene expression profiling to identify candidate genes for pretherapeutic patient classification in acute appendicitis;**

BJS Open; 2021.

Beitrag im Einzelnen:

- Patientenakquise sowie methodische Durchführung inklusive Erhebung der epidemiologischen Daten, Blutentnahme für die routinemäßig durchgeführten Laboruntersuchungen sowie Entnahme der erforderlichen Blutproben zur Weiterverarbeitung
- Isolierung der PBMCs innerhalb einer Stunde nach Probengewinnung
- Statistische Auswertung der epidemiologischen Daten sowie der Laborergebnisse
- Erstellung der Abbildung 2 sowie Tabellen 1 und 2
- Datenanalyse gemeinsam mit Dr. rer. nat. Martina Schad (OakLabs GmbH) sowie kritische Interpretation der Ergebnisse und Schlussfolgerung mit Unterstützung von PD Dr. med. Marc Reismann
- Erstentwurf und Überarbeitung der Publikation.

---

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

---

Unterschrift der Doktorandin

## 12 Lebenslauf

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

## 13 Publikationsliste

**Kiss, N.**, Minderjahn, M., Reismann, J., Svensson, J., Wester, T., Hauptmann, K., Schad, M., Kallarackal, J., von Bernuth, H. and Reismann, M. (2021) 'Use of gene expression profiling to identify candidate genes for pretherapeutic patient classification in acute appendicitis', *BJS Open*, 5(1). doi: 10.1093/bjsopen/zraa045.

Reismann, J., **Kiss, N.**, Reismann, M. (2021) 'The application of artificial intelligence methods to gene expression data for differentiation of uncomplicated and complicated appendicitis in children and adolescents - a proof of concept study', *BMC Pediatr.*, 8;21(1):268. doi: 10.1186/s12887-021-02735-8.

Reismann, J., Romualdi, A., **Kiss, N.**, Minderjahn, M. I., Kallarackal, J., Schad, M. and Reismann, M. (2019) 'Diagnosis and classification of pediatric acute appendicitis by artificial intelligence methods: An investigator-independent approach', *PLOS ONE*. Edited by P. A. T. Baltzer, 14(9), p. e0222030. doi: 10.1371/journal.pone.0222030.

## 14 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei jenen herzlich bedanken, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich ausdrücklich bei allen Patient\*innen für die Teilnahme an der Studie bedanken.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. med. Marc Reismann. Durch seine Begeisterung an der Wissenschaft, Geduld und außerordentliche Unterstützung hat er großen Anteil an der Entstehung dieser Arbeit. Zudem möchte ich mich bei meiner Zweitbetreuerin und Klinikdirektorin der Klinik für Kinderchirurgie Prof. Dr. med. Karin Rothe für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit in Ihrer Klinik zu erstellen.

Meiner lieben Kollegin Dr. med. Maximiliane Minderjahn möchte ich für den regen wissenschaftlichen Austausch sowie ihre Hilfe danken.

Prof. Dr. von Bernuth sowie seiner Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit. Besonderer Dank gilt Dipl.-Ing. Alexander Rohrbach, der stets ein offenes Ohr für mich hatte. Ebenso möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Martina Schad und Dr. rer. nat. Jim Kallarackal für die angenehme und lehrreiche Zusammenarbeit sowie stete Ansprechbarkeit bei Problemen und Fragen bedanken. PD Dr. med. Kathrin Hauptmann danke ich für ihre Unterstützung und große Expertise bei der histopathologischen Untersuchung der Proben.

Von ganzem Herzen möchte ich meinen liebevollen und mich stets unterstützenden Eltern sowie meiner Schwester Rebecca danken – sie sind meine größten Vorbilder.

Bedanken möchte ich mich zudem bei meinen Freundinnen Lisa und Nina, die mich durch die Studienzeit begleitet und diese unglaublich bereichert haben. Sie inspirieren und motivieren mich jeden Tag.

Der wohl größte Dank gilt meinem Freund Tobi für seine außerordentliche Unterstützung. Ohne seine großartige Motivation, unendliche Geduld und bedingungslose Liebe wäre diese Arbeit nicht entstanden.