

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Egbert Herting

Auswirkungen genetischer
Risikofaktoren für Erkrankungen
Erwachsener bei Frühgeborenen

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Lynn Petersen
aus Hamburg

Lübeck 2017

Erklärung

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Lübeck 2017

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Göpel

2. Berichterstatter/-in: Priv.-Doz. Dr.med. Yorck Hellenbroich

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2017

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 12.12.2017

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Für diese Arbeit relevante Erkrankungen	10
1.1.1	Lungenerkrankungen	10
1.1.2	Neurologische Erkrankungen	15
1.1.3	Glucosestoffwechsel	18
1.1.4	Gefäßerkrankungen	19
2	Material	24
2.1	Allgemeines Arbeitsmaterial	24
2.2	DNA Isolierung	24
2.3	DNA Gehalt	24
2.4	TaqMan SNP Genotypisierung	25
3	Methoden	26
3.1	DNA Proben	27
3.2	DNA Isolierung	27
3.3	DNA Gehalt der Proben	29
3.4	TaqMan SNP Genotypisierung	29
3.4.1	Vorbereiten der Reaktionsplatten	29
3.4.2	Prinzip der SNP Genotypisierung mit dem TaqMan . . .	30
3.5	Statistik	33
4	Ergebnisse	34
4.1	Klinische Daten und Genotypen	34
4.2	Lungenerkrankungen	36
4.3	Neurologische Erkrankungen	37
4.4	Glucosestoffwechsel	38

4.5	Gefäßerkrankungen	39
5	Diskussion	41
5.1	Lungenerkrankungen	43
5.2	Krampfanfälle	45
5.3	Glucosestoffwechsel	46
5.4	Gefäßerkrankungen	47
6	Zusammenfassung	49
7	Danksagung	51
8	Anhang	52
	Literaturverzeichnis	60

Abbildungsverzeichnis

3.1	Prinzip der allelischen Diskriminierung mit dem TaqMan	31
8.1	Einverständniserklärung	53
8.2	Aufklärungsbogen	54
8.3	Datenbogen für Genetische Risikofaktoren bei Frühgeborenen . .	55
8.4	Neonatalerhebungsbogen	56

Tabellenverzeichnis

1.1	Diagnosekriterien BPD	13
3.1	PCR Programm	33
4.1	Übersicht klinische Daten von 2099 Frühgeborenen	34
4.2	Genotypverteilung	35
4.3	rs4950928, Sauerstofftherapie und Beatmung	36
4.4	rs4950928 und Erkrankungen	36
4.5	Therapie assoziiert mit rs3923809	37
4.6	rs560887 und postnatale Gewichtszunahme	38
4.7	Hoher Glucosespiegel, G6PC2 und Komplikationen	39
4.8	rs1333049 und potentiell mit Gefäßerkrankungen assoziierte Komplikationen bei Frühgeborenen	40
8.1	Poweranalyse	52

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin (Nukleinsäure)
Abb.	Abbildung
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitäts-Syndrom
AMPA	engl.alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4- isoazolepropionic acid
ART	Assistierte Reproduktionstechniken
BMI	Body Mass Index
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin (Nukleinsäure)
cm	Zentimeter
CPAP	Kontinuierlich positiver Atemwegsdruck (engl.= conti- nuous positiv airway pressure)
dl	Deziliter
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
ELBW	Extrem untergewichtige Neugeborene (engl.= extremely low birth weight infants)
et al.	und andere (lat. et alii)
evt.	eventuell
FAM	Fluoreszein
FEF25-75	forcierte expiratorische Fluss zwischen 25% und 75% des ausgeatmeten Volumens
FEV1	Einsekundenkapazität
FVC	forcierte Vitalkapazität (engl. forced vital capacity)

G	Guanin (Nukleinsäure)
g	Gramm
GABA	Gammaaminobuttersäure (-acid)
Hb	Hämoglobin
HFO	Hochfrequenzoszillations Beatmung
H_2O	Wasser
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
IVH	Intraventrikuläre Hämorrhagie
kDA	Kilodalton
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	Liter
LBW	untergewichtige Neugeborene (engl.= low birth weight infants)
MAF	minor allele frequency
MEF_{50}	Maximale expiratorische Atemstromstärke bzw. Flussgewindigkeit (flow) zu dem Zeitpunkt bei dem noch 50 Prozent der VC auszuatmen sind (Lungenfunktionsprüfung)
mg	Milligramm
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
O_2	Sauerstoff
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDA	Persistierender Ductus arteriosus
PEF	Peak Expiratory Flow (Lungenfunktionsprüfung)
p.m.	post menstruationem
PLM	Periodic Limb Movements
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
RLS	Restless Legs Syndrom
ROP	Frühgeborenenretinopathie

rpm	rounds per minute
RSV	Respiratory Syncytial Virus
RV	Residualvolumen (Lungenfunktionsprüfung)
SD	Standardabweichung
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
sog.	so genannt
SSW	Schwangerschaftswoche
T	Thymin (Nukleinsäure)
T1D	Diabetes mellitus Typ 1
T2D	Diabetes mellitus Typ 2
Tab.	Tabelle
TGF beta	Transforming growth factor beta
TLR	Toll-like Receptor
u.a.	unter anderem
u.a.m.	und anderes mehr
USA	United States of America
μ l	Mikroliter
VC	Vitalkapazität (Lungenfunktionsprüfung)
VEGF	engl.=vascular endothelial growth factor
VIC	Fluoreszenzfarbstoff, Patent der Firma Applied Biosystems
VLBW	Very-low-birth-weight
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.T.	zum Teil

Kapitel 1

Einleitung

Ziel dieser Arbeit ist es, genetische Faktoren zu identifizieren die eine Rolle bei der Entstehung von typischen Erkrankungen Frühgeborener, spielen. Obwohl die neonatologische Intensivmedizin in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht hat und die Zahl der überlebenden Frühgeborenen kontinuierlich steigt [1, 2], stellt Frühgeburtlichkeit in den Industrienationen die Hauptursache für Mortalität und Morbidität bei Kindern dar. Die Mortalitätsraten von Frühgeborenen korrelieren mit dem Geburtsgewicht und dem Gestationsalter [3, 4, 5]. Ursache hierfür sind typische Erkrankungen die durch unreife Organsysteme entstehen. Dieser Umstand macht eine intensivmedizinische Versorgung nötig, die ihrerseits an einigen der Erkrankungen mit beteiligt ist. 2009 wurden in Deutschland 665.126 Kinder lebend geboren, davon 46.034 mit einem Geburtsgewicht unter 2500g (6,9%) [6].

Neugeborene (1-28. Lebenstag) können anhand ihres Geburtsgewichts in *Untergewichtige Neugeborene* (LBW) $< 2500\text{g}$, in *Sehr untergewichtige Neugeborene* (VLBW) $< 1500\text{g}$ und *Extrem untergewichtige Neugeborene* (ELBW) $< 1000\text{g}$ eingeteilt werden. Richtet man sich nach dem Gestationsalter, dann handelt es sich bei einem Kind das vor dem 259. Tag ($< 37.$ vollendete Schwangerschaftswoche) geboren wurde um ein Frühgeborenes.

Wenn die Medizin ein besseres Verständnis für die Ursachen und Risiken von Komplikationen der Frühgeborenen entwickelt, könnte die Neugeborenenversorgung verbessert werden und idealerweise Morbidität und Mortalität gesenkt werden.

Es gibt zahlreiche Risikofaktoren für Frühgeburtlichkeit. Dabei stellen vor-

herige Frühgeburten den stärksten Risikofaktor dar [7, 8]. An zweiter Stelle stehen Mehrlingsschwangerschaften. 17% der Geburten vor der 37. Schwangerschaftswoche und 23% der Geburten vor der 32. Schwangerschaftswoche sind Mehrlinge [9, 10]. Die weitverbreitete Möglichkeit einer assistierten Reproduktion führt dazu, dass es vermehrt zu Mehrlingsschwangerschaften kommt, da die Rate von Mehrlingsschwangerschaften mit assistierenden Reproduktionstechniken (ART) bei Sterilität etwa 20fach gegenüber denen natürlicher Empfängnis erhöht ist. 2010 gab es laut dem Deutschen IVF-Register 5038 Geburten nach ART, davon waren 1.052 (20,88%) Zwillinge und 43 (0,85%) Drillinge [11]. Ebenso führt eine Zervixinsuffizienz zu einer Fehl- oder Frühgeburt. Sie entsteht durch verschiedene Faktoren, dazu zählen u.a. Mehrlingsschwangerschaften, Zervixrisse bei einer vaginalen Geburt, verlängerte vorzeitige Wehentätigkeit, Verletzungen der Zervix bei einem Kaiserschnitt und operative Eingriffe an der Zervix, wie z.B. Dilatation mit Kurettage und Konisation [12, 13, 14, 15, 16, 17, 18]. Auch eine pathologische Überdehnung des Uterus durch z.B. Multiple Schwangerschaften, Polyhydramnion oder Leiomyome u.a.m. sind gut beschriebene Risikofaktoren [19, 20].

Eine kurze Zervix im Ultraschall [21] und uterine Fehlbildungen korrelieren mit einem relativen Risiko für eine Frühgeburt. Eine Frühgeburtenrate von 17% wird für einen Uterus unicornis beschrieben [22]. Frauen mit einem Uterus duplex haben ebenfalls ein höheres Risiko gegenüber Frauen mit einer normalen Anatomie (29% versus 3%) [23]. Infektionen werden in verschiedenen Studien aus unterschiedlichen Fachdisziplinen mit Frühgeburtslichkeit assoziiert. So konnten Pathologen in Plazenten von Frühgeborenen histologische Beweise für eine Chorioamnionitis in 20% bis 70% der Fälle finden. 30% bis 60% dieser Fälle hatten eine positive, mikrobiologische Kultur [24, 25, 26, 27, 28, 29]. Auch vaginale Blutungen im ersten und/oder zweiten Trimenon gehen mit einem erhöhten Risiko für Frühgeburt einher [30, 31, 32].

Wichtige kindliche Ursachen sind fetale Anomalien die mit einem Frühgeburtenrisiko bzw. mit vorzeitigen Wehen einher gehen [33, 34]. Liegt eine fetale Wachstumsrestriktion vor oder ein exzessives fetales Wachstum, so steigt das Risiko für eine Frühgeburt [35, 36, 37].

Der Fortschritt der neonatalen Intensivmedizin macht es möglich, dass ein Kind ab der vollendeten 22. Gestationswoche überleben kann. Durch die fehlende Organreife können verschiedenste Komplikationen entstehen. Man kann davon ausgehen, dass mehr als 50% der Kinder mit einem Geburtsgewicht von 600 - 1000g und mehr als 85% der Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht von 1000 - 1500g überleben.

Im Folgenden soll auf mögliche und für diese Arbeit relevante Komplikationen näher eingegangen werden.

1.1 Für diese Arbeit relevante Erkrankungen

1.1.1 Lungenerkrankungen

Kindliches Asthma bronchiale

Unter kindlichem Asthma versteht man eine anfallsweise auftretende hochgradige Atemnot, infolge variabler und reversibler Bronchialobstruktion durch Entzündung und Hyperreaktivität der Atemwege. Das Asthma bronchiale ist eine der häufigsten chronischen Erkrankungen im Kindesalter (Prävalenz 10%) [38]. Es entsteht wahrscheinlich durch das Zusammenwirken von verschiedenen Genen und zahlreichen Umwelteinflüssen. Die extrinsisch-atopische Form ist Immunglobulin-E (IgE) vermittelt, wodurch es zur Freisetzung von verschiedenen Mediatoren kommt (u.a. Histamin). Diese Mediatoren führen zu einem Bronchospasmus und später, über einen Entzündungsvorgang, zu einer Hyperreagibilität der Bronchien. Zur Diagnostik gehören u.a. Lungenfunktionstests, allerdings ist dazu die Mitarbeit des Kindes nötig, weshalb sie sich nur für Kinder ab dem 4.-6. Lebensjahr eignen. Bei einem Asthma bronchiale sind FEV_1 , VC, MEF_{50} , PEF im Anfall erniedrigt und die Resistance sowie das RV erhöht.

Ober et al. [39] haben zeigen können, dass ein Promotor SNP, rs4950928 (-131C->G) in CHI3L1, ein Chitinase 3-like 1 Gen auf Chromosom 1 (1p32.1), das für YKL-40 codiert, assoziiert ist mit erhöhten YKL-40 Serumwerten, Asthma und bronchialer Hyperreagibilität. YKL-40 ist ein 40kDA großes Heparin bindendes Glykoprotein, dessen genaue Rolle noch nicht bekannt ist. Die Serumwerte von YKL-40 sind bei Patienten mit kindlichem Asthma er-

höht, aber auch bei Patienten mit *Chronisch Obstruktiver Lungenerkrankung*, *Rheumathoider Arthritis* und verschiedenen Krebserkrankungen [40, 41, 42]. Die Serumwerte korrelieren dabei mit der Schwere des Asthmas, der Dicke der subendothelialen Basalmembran und der Lungenfunktion. Dabei sind keine Geschlechtsunterschiede festzustellen. Es konnte eine signifikante Assoziation zwischen dem rs4950928 C Allel und Asthma und einer abnehmenden FEV_1 , einem abnehmenden FEF_{25-75} Wert, sowie einem abnehmenden $FEV_1:FVC$ nachgewiesen werden. Kein signifikanter Zusammenhang konnte zwischen dem rs4950928 C Allel und einer Atopie oder erhöhten Serum IgE Werten ermittelt werden. Möglicherweise können die YKL-40 Level als Biomarker für Asthma verwendet werden. Wenn diese auch bei Frühgeborenen mit BPD erhöht sind, könnte man sie dort ebenfalls einsetzen.

Bronchopulmonale Dysplasie

Frühgeborene haben meist einen Surfactantmangel, der zum *Atemnotsyndrom* und damit zum respiratorischen Versagen führt. Eine dann durchzuführende Beatmung kann ein Barotrauma /Volutrauma, erhöhte Sauerstoffzufuhr, pulmonale und systemische Infektionen zur Folge haben, was zu Schädigungen der unreifen Lunge führt. Daraus kann eine BPD entstehen. 15-30% der Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht < 1000 g oder einer Schwangerschaftsdauer von < 28 Wochen erkranken an einer BPD, bei Frühgeborenen, die nach der 32. Schwangerschaftswoche geboren werden, ist die Erkrankung eine Rarität [43, 44]. Obwohl die Effekte im Erwachsenenalter noch nicht vollständig bekannt sind, ist doch klar, dass frühe Verletzungen der Lunge lebenslange Konsequenzen nach sich ziehen. So haben VLBW Kinder ein wesentlich erhöhtes Risiko für Krankenhausaufenthalte auf Grund von Lungenerkrankungen im Erwachsenenalter [45].

Bei der BPD handelt es sich um eine schwere Lungenerkrankung der Frühgeborenen, die bei 10-20% der Kinder mit einem Geburtsgewicht von 1000 - 1500g und bei 20-50% der Kinder mit einem Geburtsgewicht von 500 - 1000g auftritt [46]. Bei Frühgeborenen, die nach der 32. Schwangerschaftswoche geboren werden kommt die BPD so gut wie nicht vor. Sie entwickelt sich aus dem Zusammenwirken der unreifen Lunge der Frühgeborenen, einem Barotrauma, durch die maschinelle Beatmung mit hohem Inspirationsdruck und der Toxi-

zität von Sauerstoff, sowie erblichen Faktoren [47, 48]. Diese Faktoren führen zu zwei pathophysiologischen Prozessen oder einer Mischung aus beiden:

1. Atemwegsverletzungen, Entzündung und Alveolarfibrose durch Sauerstoff, Barotrauma und Infektionen. Diese Veränderungen treten gehäuft bei Kindern mit BPD auf, die vor der Einführung von moderneren Therapien geboren wurden. Man spricht deshalb auch von der „klassischen“ BPD.
2. Eine Unterbrechung der Lungenentwicklung, mit einer Rarifizierung der Alveolarsepten, was zu weniger und größeren Alveolen und einer Fehlgestaltung der Gefäßversorgung führt. Diese Veränderungen treten bei Kindern auf, die geboren wurden als die Therapie mit pränatalen Glucokortikoidgaben und Surfactant etabliert war. Diese Kinder wurden auch weniger traumatisch beatmet und erhielten geringere Sauerstoffmengen, hatten im Vergleich allerdings das geringere Geburtsgewicht. Man spricht in diesen Fällen von der „neuen“ BPD [49].

Bei beatmungsbedingter Hyperoxie entstehen freie Radikale, besonders Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid, die die Funktion von Enzymen beeinträchtigen können. Neugeborene haben eine verminderte Fähigkeit diese Radikale abzubauen. Dies erklärt sich durch die geringere Aktivität der Superoxiddismutase, einem Enzym das Superoxidradikale in Wasserstoffperoxid umwandelt. Wasserstoffperoxid wiederum wird von den Enzymen Glutathionperoxidase und Katalase zu Sauerstoff und Wasser abgebaut, deren Aktivität ebenfalls vermindert ist [50]. Dieser Sachverhalt macht die besondere Sauerstofftoxizität in der Neonatalperiode deutlich.

Tabelle 1.1 zeigt die Definition und wichtige diagnostische Kriterien der BPD.

Für die Diagnosestellung beurteilt man Kinder mit einem Gestationsalter kleiner 32. Wochen in der 36. Woche und Kinder mit einem Gestationsalter größer gleich 32 Wochen zwischen dem 29. und 55. Lebenstag bzw. bei Entlassung. Man stellt die Schwere der Erkrankung fest, indem man den Sauerstoffbedarf bzw. die Notwendigkeit einer Betamung oder CPAP Therapie zu diesem Zeitpunkt beurteilt. In den aktuellen Leitlinien ist dazu eine „physiologische“ Definition von Walsh et al. aufgenommen worden. Demnach sollen Frühgeborene, die im Alter von 36 Wochen p.m. einen zusätzlichen Sauerstoffbedarf aufweisen, einem Belastungstest unterzogen werden. Dabei wird in definierten Schritten der Sauerstoff bis auf Raumluftniveau entzogen und die Sauerstoff-

Gestationsalter	≤ 32 Wochen	≥ 32 Wochen
Beurteilungszeitpunkt	36 Wochen p.m. oder bei Entlassung	≥ 28 Tage aber ≤ 56 Tage postnatal oder bei Entlassung
Sauerstoffgabe $\geq 21\%$ für mindestens 28 Tage und		
leichte BPD	Raumluft ab 36 Wochen p.m.	Raumluft ab 56 Tage postnatal
mittelschwere BPD	22-29% Sauerstoffbedarf ab 36 Wochen p.m.	22-29% Sauerstoffbedarf ab 56 Tage postnatal
schwere BPD	$\geq 30\%$ Sauerstoffbedarf und/oder Beatmung ab 36 Wochen p.m.	$\geq 30\%$ Sauerstoffbedarf und/oder positiv pressure ventilation ab 56 Tage postnatal

Tabelle 1.1: Diagnosekriterien BPD

sättigung dieser Kinder kontrolliert und beurteilt. Patienten, die während des Sauerstoffentzugs und für eine halbe Stunde unter Raumluft eine minimale Sauerstoffsättigung von größer 90% halten können, haben demzufolge keine BPD [51]. Umgekehrt heißt das, dass die Frühgeborenen, die ohne zusätzlichen Sauerstoff eine Sättigung von mindesten 90% nicht halten können, eine BPD haben. Unterschieden werden soll dabei, wie die Tabelle 1.1 illustriert, zwischen einer moderaten (FiO_2 22-29%) und einer schweren ($FiO_2 \geq 30\%$) BPD.

Prävention und Therapie: Bei drohender Frühgeburt werden zur Lungenreifung pränatal Kortikosteroide verabreicht. Diese reduzieren die Inzidenz des Atemnotsyndroms und die Beatmungsabhängigkeit, wenn zwischen der ersten Gabe und der Geburt mindestens 24 Stunden liegen. Nicht ausreichend belegbar ist der Effekt pränatal verabreichter Kortikosteroide auf die BPD-Rate [52].

Die postnatale Gabe von Kortikosteroiden senkt laut Leitlinie die BPD-Rate, aber nicht die Mortalität. Wobei die Indikation zur Dexamethasontherapie streng zu stellen ist, da Studien zeigen konnten, dass VLBW Kinder, die mit Dexamethason behandelt wurden, im Klein- und Schulkindalter kognitiv schwächer waren und eine höhere Rate an Cerebralpareesen aufweisen [53].

Einige Studien, u.a. Wattenberg et.al., konnten zeigen, dass signifikante neurologische Nebenwirkungen nicht bei ELBW Kindern auftraten, die postnatal mit Hydrocortison anstatt Dexamethason therapiert wurden [54].

Unerwünschte Wirkungen der Glucocorticoidtherapie, wie Hyperglycämien, Hypertonie und gastrointestinale Blutungen sowie intestinale Perforation sollten nicht außer acht gelassen werden [55, 56]. Deshalb sollte Dexamethason nicht vor dem 8. Lebenstag und nur bei beatmeten Frühgeborenen möglichst niedrig dosiert und kurz gegeben werden.

In einigen Langzeitstudien stellte sich heraus, dass bei Kindern mit BPD in der Anamnese im Alter von 6-15 Jahren weiterhin bronchiale Obstruktion, Hyperreaktivität und Entzündung nachweisbar sind [57, 58, 59, 60, 61]. Wie beim Asthma ist bei diesen Kindern bis zu einem Alter von 3 Jahren die Vitalkapazität und die FEV_1 erniedrigt, sowie das RV erhöht. Episoden mit expiratorischen Stenosegeräuschen wie beim Asthma, sind bei Kindern und Teenagern mit BPD in der Krankengeschichte häufig [62, 63, 64] und bei 40-50% der Kinder mit BPD in der Anamnese kann eine Hyperreagibilität der Atemwege bei körperlicher Belastung, bei Histamin- und Methacholinprovokation nachgewiesen werden [65]. Auch neuere Studien, wie die von Baraldi, belegen, dass ehemalige BPD Patienten im Schulalter und jungem Erwachsenenalter häufig eine klinisch inapparente variable Atemwegsobstruktion aufweisen [66]. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Patienten überwiegend die gleichen Symptome haben. Angemerkt werden sollte, dass die Prävalenz der Hyperreagibilität sich nicht von der Frühgeborener ohne BPD unterscheidet.

Wenn man Polymorphismen nachweisen konnte, die mit einer bronchialen Hyperreagibilität und Asthma assoziiert sind und bekannt ist, dass viele der Kinder mit BPD ein Asthma entwickeln, gleiche Symptome und Merkmale zeigen, so stellt sich die Frage, ob sich die „Asthma SNP“-Varianten auch bei den Frühgeborenen nachweisen lassen, die eine BPD entwickeln.

Wenn dem so sein sollte, hat man vielleicht ein Instrument mit dem man das Problem der späten Diagnosestellung einer BPD umgehen kann. Treten in der ersten Lebenswoche klinische Frühzeichen einer sich entwickelnden BPD bei einem Frühgeborenen auf, wie persistierende Atemnot, Sauerstoffabhängigkeit und typische radiologische Veränderungen, so könnte man nach den entsprechenden „Asthma SNP“-Varianten suchen.

1.1.2 Neurologische Erkrankungen

Neonatale Krampfanfälle

Das Risiko für Krampfanfälle steigt mit sinkendem Geburtsgewicht und niedrigem Gestationsalter. So treten bei VLBW -Kindern Krampfanfälle mit einer Häufigkeit von bis zu 10% auf.

Krämpfanfälle werden als unwillkürliche, selbst limitierende Muskelkontraktionen definiert. Sie sind Ausdruck von abnormen, exzessiven, synchronen Entladungen zerebraler Neuronen. Wahrscheinlich sind diese Dysfunktionen der Neuronen getriggert durch metabolische Störungen (hohes Fieber, Hypokalzämie, Hyponaträmie), Schädel-Hirn-Traumata, Ischämien, Infektionen (Meningitis, Encephalitis, Sepsis), Blutungen u.a.m.. Krampfanfälle können auch die Manifestation einer chronischen Störung der neuronalen Funktion sein, wie z.B. perinatale Asphyxie, genetische Erkrankungen, Hirntumoren oder neurodegenerative Erkrankungen. Von diesen sog. symptomatischen Krampfanfällen werden idiopathische Krampfanfälle und Epilepsien unterschieden, wobei es vererbare Formen gibt. Krampfanfälle treten bei Neugeborenen im Vergleich zu allen anderen Altersgruppen am häufigsten auf.

Es ist klinisch schwierig zu entscheiden welche Bewegungsphänomene bei Frühgeborenen wirklich Krampfanfälle darstellen bzw. Bewusstseinsveränderungen zu ermitteln. Das liegt zum einen daran, dass die typischen EEG Veränderungen, Spikes über der Frontal- und Zentralregion, auch bei Neugeborenen zu finden sind die keine klinischen Anzeichen von Anfällen zeigen und zum anderen ist die Morphologie der Anfälle bei Frühgeborenen anders als bei Reifgeborenen und älteren Kindern, sie erscheint weniger komplex. Auch ist es möglich, dass Krämpfanfälle, die in den subkortikalen Regionen des Gehirns entstehen, im EEG nicht detektierbar sind. Typische generalisierte *tonisch-klonische Anfälle* und *Absencen* treten sehr selten in den ersten zwei Lebensjahren auf und kommen bei Neugeborenen nicht vor [67].

Neugeborenenkrämpfe sind vorübergehende Ereignisse mit Zeichen und/oder Symptomen von abnormaler und übermäßiger neuronaler Aktivität des Gehirns. Epilepsie ist ein Zustand mit wiederkehrenden Krämpfen. Bei Untersuchungen einiger pädiatrischer Epilepsiezentren stellte sich heraus, dass 20%

der überwiesenen Kinder keine epileptischen Anfälle hatte [68, 69]. Könnte es also sein, dass einige Frühgeborenen gar keine Krampfanfälle haben, sondern andere Bewegungsstörungen vorliegen?

Besonders *Fokal-Klonische Anfälle* bestehen aus repetitiven, rhythmischen Kontraktionen einzelner Muskelgruppen der Extremitäten, des Gesichts oder des Rumpfes, erscheinen also ähnlich wie das RLS. Gleiches gilt für Myoklonien. Darunter versteht man ebenfalls Kontraktionen definierter Muskelgruppen, der Extremitäten (im ganzen oder nur distale Abschnitte), des Rumpfes, des Zwerchfells oder des Gesichts. Sie unterscheiden sich von klonischen Anfällen durch die Wiederholungsrate und die Persistenz.

Das bei Früh- und Neugeborenen am häufigsten verwendete Antiepileptikum ist Phenobarbital (5-Ethyl-5-phenylbarbitursäure), ein Barbiturat mit langer Wirkdauer. Es bindet und aktiviert inhibitorische $GABA_A$ -Rezeptoren im zentralen Nervensystem (ZNS). GABA (Gammaaminobuttersäure (-acid)) ist der wichtigste hemmende Neurotransmitter im ZNS. Phenobarbital blockiert außerdem den AMPA-Rezeptor, eine Untergruppe der Glutamatrezeptoren. Glutamat ist der wichtigste erregende Neurotransmitter im ZNS. Insgesamt ergibt sich daraus eine dämpfende Wirkung.

Restless Legs Syndrom und Periodic Limb Movements

Beim Restless Legs syndrom (RLS) kommt es zu einem nicht unterdrückbaren Drang die Lage der Beine zu verändern. Besonders in Ruhe, meistens am Abend und in der Nacht, kommt es zu Missempfindungen wie Ziehen, Kribbeln, Spannen und typischerweise auch zu uncharakteristischen Schmerzen. Die Symptome bessern sich durch Bewegung. Die Missempfindungen führen zu Ein- und Durchschlafstörungen und nach dem Einschlafen zu periodischen, stereotypischen Bewegungen der Gliedmaßen (PLM in sleep), diese können zu wiederholtem kurzen Aufwachen, sog. Arousals, führen. Dadurch kann es zu ernst zu nehmenden Schlafstörungen kommen. Die Ursachen dieser Erkrankung sind noch nicht abschließend geklärt. Meist tritt das RLS idiopathisch auf, allerdings auch familiär gehäuft, bei Schwangerschaft, bei Einnahme von Dopaminantagonisten, bei Urämie und bei Störungen des Eisenstoffwechsels (niedriges Ferritin <50 ng/ml). Es kommen ein gestörter Transmitterstoffwechsel, besonders des Dopamins, und Veränderungen in der Substantia nigra in

Betracht. Man konnte zeigen, dass es zu einer Aktivierung der Nuclei ruber und des Hirnstammes kommt, wenn die Symptome auftreten. Für die Diagnostikstellung wurden vier essentielle Kriterien aufgestellt: Bewegungsdrang der Beine, meist assoziiert mit sensiblen Störungen unterschiedlicher Qualität oder Schmerzen. Ausschließliches Auftreten in Ruhe und Entspannung. Besserung oder sistieren durch Bewegung. Zirkadiane Rhythmik mit Überwiegen der Symptome am Abend und in der Nacht. Zusatzkriterien sind positives Ansprechen auf Dopamin, Ein- und Durchschlafstörungen und eine positive Familienanamnese [70]. Das RLS kommt sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen vor, wobei die Prävalenz mit dem Alter zunimmt [71]. Kinder zwischen 8 und 17 Jahren sind zu etwa 2% betroffen, bei ihnen hatte in über 70% zumindest ein Elternteil ebenfalls das RLS [72]. Verschiedene Studien identifizierten Genloci auf unterschiedlichen Chromosomen, 2q [73], 6p[74, 75], 9p [76, 77], 12q [78, 79], 14q [80], 15q [75] und 20p [81] die für das RLS prädisponieren.

Das häufigere Allel A des SNP rs3923809, im Intron des BTBD9 Gens auf Chromosom 6p21.1 ist signifikant mit dem RLS und PLM assoziiert. Dies gilt auch für Patienten die nur PLM haben, die Kriterien für ein RLS aber nicht erfüllen. Bei Patienten mit RLS ohne PLM in sleep ergab sich keine Assoziation mit dem A Allel. Es bestehen zudem zweimal so viele Limb Movements pro Stunde bei AA homozygoten Patienten gegenüber GG homozygoten [74]. Es wurde also eine genetische Determinante für PLM identifiziert und es wäre interessant zu erfahren, ob das A Allel des rs3923809 SNPs auch mit PLM in einem anderen Kontext außer dem RLS assoziiert ist.

Da es, wie oben beschrieben, schwierig ist Krampfanfälle bei Frühgeborenen zu diagnostizieren, haben wir uns die Frage gestellt, ob diese Bewegungsphänomene bei Frühgeborenen nicht mit dem rs3923809 Polymorphismus assoziiert sein könnten und ob deshalb Frühgeborene, die das A-Allel des rs3923809 tragen, häufiger mit Phenobarbital behandelt werden.

1.1.3 Glucosestoffwechsel

Der Glucosestoffwechsel hat eine zentrale Bedeutung für das Wachstum und die normale Entwicklung des Gehirns von Feten und Neugeborenen.

Diabetes mellitus

Diabetes Typ 2

Der Typ 2 Diabetes (T2D) ist eine chronisch, metabolische Erkrankung, die meist erst im Erwachsenenalter diagnostiziert wird.

Man konnte zeigen, dass der SNP rs560887 eine Rolle bei „Nüchtern Plasmaglucosespiegeln“ und bei der Funktion der beta-Zellen im Pankreas spielt. Er ist auf Chromosom 2 im Intron 3 des G6PC2 (glucose-6-phosphatase catalytic unit 2) Gens lokalisiert. Dieses Gen codiert für die katalytische Untereinheit 2 von Glucose-6-Phosphatase, die selektiv in den Inselzellen des Pankreas exprimiert wird. Man geht davon aus, dass G6PC2 die Glycolyse und auch die durch Glucose stimulierte Insulinsekretion beeinflusst, indem es Glucose-6-Phosphat dephosphoryliert. G6PC2 knockout Mäuse zeigen einen erniedrigten „Nüchtern Plasmaglucosespiegel“ und eine normale Insulinsensitivität. Das A Allel des SNP rs560887 ist assoziiert mit erniedrigten „Nüchtern Plasmaglucosewerten“ und erniedrigten HbA1c (glycogeniertes, adultes Hämoglobin) Werten. Weitere Analysen haben ergeben, dass Träger des rs560887 A Allels ein geringeres Risiko haben eine milde Hyperglycämie zu entwickeln. Es besteht kein Zusammenhang mit „Nüchtern Insulinspiegeln“ und BMI (Body Mass Index) bei übergewichtigen Kindern und es gibt keine Assoziation mit einem erhöhten Risiko für Typ 2 Diabetes [82].

Hyperglykämie bei Frühgeborenen

Die meisten Frühgeborenen benötigen eine parenterale Zufuhr von Glucose, da eine adäquate enterale Zufuhr fehlt. In diesem Zusammenhang treten häufig Hyperglykämien auf. Hyperglykämie ist ein signifikanter Risikofaktor für Mortalität und Morbidität bei Frühgeborenen und kommt bei ELBW Kindern in 40-80% vor [83], wobei das Risiko für Hyperglykämien mit sinkendem Gestationsalter steigt, aber nicht bzw. nur gering vom Geburtsgewicht abhängt [84, 85]. Die erhöhten Blutzuckerspiegel führen zu Polyurie und damit zur De-

hydrierung. Diese hat zur Folge, dass es zu erhöhter Serumosmolarität und intrakraniellen Blutungen kommen kann [46]. Man kennt bis heute nicht den genauen Grund für die Hyperglykämie bei Frühgeborenen. Sie ist oft mit einer Insulinresistenz verbunden, von der man glaubt, dass sie durch eine während der Hyperglykämie persistierende hepatische Glucoseproduktion entsteht, weiterhin scheint auch eine periphere Insulinresistenz beteiligt zu sein [86]. Ein neonataler Diabetes mellitus ist sehr selten. Er ist definiert als persistierende Hyperglykämie in den ersten Lebensmonaten, die über mehr als zwei Wochen andauert und eine Insulintherapie notwendig macht. Als Therapie der Hyperglykämie bei Neugeborenen (ab Blutzuckerwerten zwischen 180-200 mg/dl) wird empfohlen, die Glucosezufuhr zu reduzieren und Insulininfusionen zu geben. Dabei sollte der Blutzucker zwischen 80 und 160 mg/dl gehalten werden [46]. Ein früher routinemäßiger Einsatz von Insulin sollte vermieden werden, da er die Mortalität erhöht. Wenn bei Hyperglykämie die Reduzierung der Glucosezufuhr auf 6mg/kgKG erfolglos bleibt, ist eine Insulintherapie weiterhin sinnvoll [87].

Die vorliegende Arbeit untersucht ob Frühgeborene, die das A-Allel des rs560887 Polymorphismus tragen, seltener mit Insulin behandelt werden müssen.

1.1.4 Gefäßerkrankungen

Koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt

Eine *Koronare Herzerkrankung* (KHK) entsteht auf dem Boden von Atherosklerose der Koronargefäße, wodurch es hauptsächlich zu Angina pectoris Anfällen und Myokardinfarkten kommt. Eine endotheliale Dysfunktion führt zur Atherosklerose. Ursachen der endothelialen Dysfunktion sind sog. kardiovaskuläre Risikofaktoren, dazu zählen u.a. arterieller Hypertonus, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und genetische Faktoren. Bleibt die endotheliale Dysfunktion bestehen, kommt es zu einem Entzündungsprozess und zur Proliferation im subintimalen Raum des Gefäßes. Im Verlauf kommt es zu weiteren Veränderungen die schließlich zu einer stenosierenden Plaque führen. Die Stenose oder aus den Plaques gelöste Thromben führen zu Hypoxie des anschließenden Stromgebietes, was sich als Angina pectoris und/oder Myokardinfarkt

äußert.

Eine Arbeitsgruppe [88] hat 2007 den SNP rs1333049 (MAF=0,494), mit dem selteneren C Allel, auf Chromosom 9p21.3 identifiziert, der mit KHK und Myokardinfarkt assoziiert ist. Untersucht wurden Patienten, die vor dem 60. bzw. 66. Lebensjahr einen Myokardinfarkt hatten, wie auch Patienten mit großem familiären Risiko. Es stellte sich heraus, dass jede Kopie des C Allels die Wahrscheinlichkeit zu erkranken erhöht. Die Region enthält außerdem die codierenden Sequenzen für zwei Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitoren CDKN2A (codiert für das INK4 Protein p16INK4a) und CDKN2B (codiert für p15INK4b), die eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklusses spielen und vielleicht sind sie, durch ihre Rolle in der TGF-beta- induzierten Wachstumsinhibition, an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt. TGF-beta gehört zu den *transforming growth factors*. Es handelt sich um ein Protein, das u.a. Proliferation und Differenzierung in vielen Zellen kontrolliert. TGF-beta stoppt den Zellzyklus in der G1 Phase über die Cyclin-abhängige-CDK-Kinase und so die Proliferation. Dadurch spielt es nicht nur eine Rolle im Immunsystem und bei Krebserkrankungen, sondern auch bei Herzerkrankungen, Diabetes mellitus und dem Marfan Syndrom. Es fungiert in normalen Epithelien und in der frühen Onkogenese als Antiproliferationsfaktor [89] und kann die Apoptose induzieren. Die Ansprechbarkeit kardiovaskulärer Zellen auf diese protektiven Eigenschaften von TGF-beta wird wahrscheinlich von Cholesterin verringert, was die Entstehung von Atherosklerose begünstigt.

Hypertension, Myokardinfarkt und Frühgeburtlichkeit

Es gibt Daten, die für eine mögliche Beteiligung eines geringen Geburtsgewichts an der Entwicklung einer essentiellen Hypertonie im Erwachsenenalter sprechen, allerdings weniger deutlich als in früheren Studien [90] angenommen. Um diesen möglichen Zusammenhang zu erklären gibt es unterschiedliche Hypothesen. Eine gut untersuchte Hypothese geht von einer „kongenitalen Oligonephropathie“ aus, diese entsteht auf Grund von intrauterinen Wachstumsstörungen, die zu einer gestörten Entwicklung der Nieren führt. Man findet eine geringe Anzahl Nephrone in den Nieren von Menschen mit geringem Geburtsgewicht, was zu einer kompensatorischen Erhöhung des Blutdruckes führt [91, 92]. Untersuchungen ergaben, dass der Blutdruck von Frühgeborenen im

Vergleich zu Reifgeborenen im Erwachsenenalter höher lag und dass ihre Nieren im Ultraschall kleiner sind [93, 94]. Dies passt zu der Beobachtung, dass die Anzahl der Nephrone bei Frühgeborenen geringer ist [95].

Da Gefäßveränderungen die Grundlage verschiedener Erkrankungen des Frühgeborenen sind, z.B. *Frühgeborenenretinopathie* (ROP) , Hirnblutungen, *persistierende Ductus arteriosus* und zur Frühgeburt führende Plazentainsuffizienz, wird in der vorliegenden Arbeit die Häufigkeit dieser Komplikation bei Frühgeborenen mit unterschiedlichem rs1333049 Genotyp bestimmt.

Frühgeborenenretinopathie

Bei der *Frühgeborenenretinopathie* handelt es sich um eine Vaskularisierungsstörung, die zu retinalen Blutungen führt [96, 97]. Je unreifer ein Kind ist desto höher liegt die Inzidenz. Sie schwankt nach einer multizentrischen Studie in den USA (2000 bis 2002) zwischen 8% für Kinder die > 32 SSW geboren wurden, 19% für Kinder die von der 27 bis 31 SSW geboren wurden und 43% für Kinder die < 27 SSW geboren wurden [98].

Normalerweise ist die Vaskularisierung der Retina ca. in der 36. Schwangerschaftswoche in den nasalen Anteilen und ca. in der 40. SSW in den temporalen Anteilen abgeschlossen, folglich bei Frühgeborenen noch unvollständig. Als Wachstumsreiz herrscht intrauterin in der Retina Sauerstoffmangel, mit einem Sauerstoffpartialdruck von etwa 30mmHg. Postnatal steigt dieser, besonders unter Beatmung, auf 90-100mmHg oder mehr. Auch wenn die Pathogenese noch nicht vollständig geklärt ist, geht man davon aus, dass der sauerstoffabhängige VEGF (*vascular endothelial growth factor*) infolge der postnatalen Hyperoxie gehemmt wird. Das führt in der Frühphase der ROP zu einer Obliteration bereits existierender Retinagefäße. Im weiteren Verlauf bilden hypoxische Retinaabschnitte VEGF, woraus eine pathologische Neovaskularisation entsteht. Die neu gebildeten Gefäße wachsen in den Glaskörper, es kommt zu Blutungen und zur Bildung von fibrovaskulären Strängen. Diese können Zug auf die Retina ausüben, sodass es zur Netzhautablösung und schlimmstenfalls zur Erblindung kommt, meistens jedoch erfolgt eine spontane Regression.

Persistierender Ductus arteriosus

Der Ductus arteriosus (PDA) ist eine normale Kurzschlussverbindung zwischen Pulmonalarterie und Aorta, zur Umgehung der Lunge im fetalen Kreislauf. Nach der Geburt verschließt sich dieser normalerweise. Bleibt die Verbindung länger bestehen spricht man vom PDA. Es kann ein Links-Rechts-Shunt entstehen, mit Lungenödem und Mangeldurchblutung im großen Kreislauf. Oft bleibt ein PDA aber auch klinisch stumm. Die Inzidenz des PDA korreliert invers mit dem Gestationsalter, bei etwa 30% der VLBW Kinder tritt er auf [99]. Nach der Geburt kommt es durch steigenden Sauerstoffpartialdruck zur Konstriktion des PDA und zum endgültigen Verschluss durch Proliferation und Fibrosierung des Endothels, ähnlich wie bei der Atherosklerose. Dabei ist TGF- β vielleicht beteiligt. Bei Frühgeborenen reagiert die unreife Muskulatur im PDA nicht ausreichend auf den Konstriktionsreiz.

Plazentainsuffizienz

Man unterscheidet zwischen einer chronischen und einer akuten Plazentainsuffizienz. Die akute geht meist mit einer vorzeitigen Plazentalösung einher, die chronische Plazentainsuffizienz ist bedingt durch z.B. Diabetes mellitus, Präeklampsie, (Schwangerschafts induzierter -) Hypertonus, Niereninsuffizienz und Infektionen. Dies alles kann zu einer Frühgeburt führen. Eine Gefäßbeteiligung liegt bei allen diesen Erkrankungen vor, sodass man hier ebenfalls einen Einfluss von SNP rs1333049 vermuten könnte.

Hirnblutungen bei Frühgeborenen

Viele Frühgeborene versterben an intraventrikulären Blutungen [100, 101], die aufgrund der fragilen Anatomie entstehen [99]. Die Ätiologie der Erkrankung ist noch nicht geklärt. Ungünstig wirken sich Hypoxie, Hyperkapnie, Hypothermie und Hyperglykämie aus.

Zusammenfassend möchte die vorliegende Arbeit folgende Fragestellungen klären:

- 1) Haben Frühgeborene, die homozygote Allelträger des Asthma Risikoallels rs4950928 C sind, ein erhöhtes Risiko für eine Sauerstofftherapie oder die Entwicklung einer BPD?
- 2) Werden Frühgeborene, die homozygote Träger des Restless legs-Risiko-Allels rs39233809 A sind, gehäuft mit Phenobarbital behandelt?
- 3) Ist das homozygote C Allel des Polymorphismus rs560887 mit einem gehäuften Auftreten einer Insulintherapie assoziiert?
- 4) Treten bei Frühgeborenen, die homozygot für das C Allel des rs1333049 Polymorphismus sind, gehäuft vaskuläre Komplikationen wie Hirnblutung und operationspflichtige Frühgeborenenretinopathie auf?

Kapitel 2

Material

2.1 Allgemeines Arbeitsmaterial

Pipetten Reference 0,5 μ l-10 μ l, 10 μ l-100 μ l, 100 μ l-1000 μ l Eppendorf GmbH, Hamburg

Filter Tips steril, RNase/DNase free, GreinerBio-One GmbH, Frickenhausen

Vortex, IKA, Staufen

2.2 DNA Isolierung

Abstrichröhrchen, steril, Hain Diagnostic GmbH, Nehren

Reaktionsgefäße 1,5 ml, Eppendorf GmbH, Hamburg

QIAmp DNA mini Kit, Qiagen, Hilden

Absoluter Ethanol, Merck, Darmstadt

Thermoschüttler, Eppendorf GmbH, Hamburg

Zentrifuge, Eppendorf GmbH, Hamburg

2.3 DNA Gehalt

Pico-Green dsDNA Quantitation Kit, MoBiTec, Göttingen

2.4 TaqMan SNP Genotypisierung

PCR Platten 384 well, Eppendorf GmbH, Hamburg

Multiply-PCR Plate 384 well, Sarstedt AG und Co., Nümbrecht

DNA Proben

Multipette stream $5\mu\text{l}$ - $100\mu\text{l}$, Eppendorf GmbH, Hamburg

TaqMan SNP Genotyping Assay, Applied Biosystems, USA

Aqua a iniectabila, Delta Select GmbH, Pfullingen

Crystalq PCR Film optical clear für Fluoreszenz, Biolab Products, Gödenstorf

Zentrifuge Rotanta 460R, Hettich, Tuttlingen

Thermal Cycler, Thermo Hybaid, Ulm

TaqMan ABIPRISM 7900HT, Applied Biosystems, USA

SDS 2.2.2. Software, Applied Biosystems, USA

Kapitel 3

Methoden

Um einen Zusammenhang zwischen genetischer Variation und dem Auftreten von Erkrankungen zu überprüfen, nutzten wir eine Assoziationsstudie. Diese sind besonders gut geeignet genetische Varianten zu identifizieren, die bei multifaktoriell bedingten Erkrankungen oft nur als Risikofaktoren wirken. Ermöglicht wird das u.a. durch die Analyse von *single nucleotide polymorphisms* (SNP) [102]. SNP's sind Variationen einzelner Basenpaare in einer bestimmten Position innerhalb eines DNA Stranges, z.B. in einem Gen. Diese Punktmutationen bestehen auch zwischen Individuen der gleichen Spezies und korrelieren mit Prädispositionen für bestimmte Erkrankungen. Die Häufigkeit des selteneren Allels eines SNP's, die *minor allele frequency* (MAF), in einer Population ist größer als 1% [103]. Man geht davon aus, dass sog. common SNP's (MAF >5%) für mehr als 90% aller Variationen im humanen Genom verantwortlich sind. [104, 105]

In die Studie wurden nur Kinder eingeschlossen die keine letalen Fehlbildungen hatten, deren Geburt zwischen der 24+0 und 36+6 Schwangerschaftswoche (im Mittel 29 SSW) lag, die ein Geburtsgewicht <1500g hatten und stationär aufgenommen wurden. Dieser Umstand ermöglichte uns die retrospektive Analyse der klinischen Daten, da alle relevanten Ereignisse auf den Intensivstationen erfasst und standardisiert dokumentiert wurden. Die Verlegung aus anderen Kliniken war ein Ausschlusskriterium. Um eine möglichst große Fallzahl zu erhalten nahmen 16 deutsche Kliniken an der Studie teil, die mehr als 40 Frühgeborene <1500g pro Jahr betreuen. (siehe Tabelle 4.1 und

siehe Seite 57). Nach der unterschriebenen Einverständniserklärung wurden die Proben an unser Labor versandt (siehe Seite 54 und Seite 53).

Es wurden u.a. folgende, für unsere Untersuchung relevanten Daten erfasst: Gestationsalter, Geburtsgewicht, Dauer der Sauerstoffgabe, Beatmungsdauer, Medikamente, Pneumothorax, Krampfanfälle, IVH, ROP, Gewichtszunahme (g/d) und Tod siehe Seite 56 und Seite 55. Die Informationen aus beiden Datenblättern wurden nach Eingabe in eine Datenbank anonymisiert und die DNA zur Analyse freigegeben.

Die zuständige Ethikkommission hat dem Antrag zu dieser Studie zugestimmt, Aktenzeichen: 99-047.

3.1 DNA Proben

Zur Gewinnung von DNA verwendeten wir Mundschleimhautabstriche, die mittels sterilem Tupfer bei Frühgeborenen entnommen wurden. Die Entnahme der Mundschleimhautabstriche wurde wie folgt durchgeführt:

Öffnen des Abstrichröhrchens, ohne den sterilen Tupfer an der Kappe zu berühren, den Tupfer 6-10 mal mit festen, rollenden Bewegungen an der Mundschleimhaut der Wangentaschen entlang streichen und ohne die Außenseite des Röhrchens zu berühren, den Tupfer zurückstecken. Kennzeichnen des Abstrichröhrchens mit Namen und Geburtsdatum.

3.2 DNA Isolierung

Die Extraktion der DNA erfolgte mittels des QIAmp DNA mini Kit von Qiagen. Das Prinzip basiert auf der kurzfristigen Bindung der DNA an Silikatsäulen. Dort wird die DNA durch spezielle Lösungen gereinigt und dann in einer wässrigen Lösung eluiert [106]. Wir arbeiteten nach folgendem Protokoll:

Vorbereitung:

Protease auftauen

Thermoschüttler auf 56°C vorheizen

Je Proband zwei 2 ml Reaktionsgefäße beschriften.

Abbrechen der Tupfer im ersten Reaktionsgefäß.

Vorgehen:

- Zugabe von 400 μ l PBS, vortexen
- Zugabe von 400 μ l AL-Puffer und 20 μ l Protease, sofort 15sec vortexen
- Inkubation 1 Stunde bei 56°C im Thermoschüttler, Stufe 11
- Zugabe von 400 μ l absoluten Ethanol, vortexen
- Zentrifugation 1 Minute bei 8000rpm
- Aufbringen von 600 μ l Probe auf eine identisch beschriftete Qiamp-Säule mit zugehörigem Auffanggefäß
- Zentrifugation 1 Minute bei 8000rpm
- Aufsetzen der Säule auf ein neues Auffanggefäß und Aufbringen des restlichen Materials
- Zentrifugation 1 Minute bei 8000rpm
- Aufsetzen der Säule auf eine neues Auffanggefäß und Aufbringen von 500 μ l
- Waschpuffer 1
- Zentrifugation 1 Minute bei 8000rpm
- Aufsetzen der Säule auf eine neues Reaktionsgefäß und Aufbringen von 500 μ l Waschpuffer 2
- Zentrifugation 1 Minute bei 13200rpm
- Aufsetzen der Säule auf das 2. beschriftete Reaktionsgefäß und Aufbringen von 200 μ l AE-Puffer
- Zentrifugation 1,5 Minuten bei 9000rpm
- Aufbringen von weiteren 200 μ l AE-Puffer auf die Säule und Inkubation 5 Minuten

- Zentrifugation 1,5 Minuten bei 9000rpm
- Säule verwerfen, Probe bei minus 20°C einfrieren.

3.3 DNA Gehalt der Proben

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig - Holstein Campus Lübeck bestimmten wir die Konzentration von einigen DNA Proben. Dazu verwendeten wir den Quant-iT Pico-Green dsDNA Assay Kit der Firma Molecular Probes, Inc.. Hierbei wird doppelsträngige DNA fluoreszenzmarkiert und die Konzentration am Fluorometer bei 260 nm gegen eine Standardreihe gemessen. Die von uns isolierte DNA Menge lag im Median bei 1,79 ng/ μ l (Range 0,2-7,2 ng/ μ l). Bei einem Testlauf mit genau 1ng DNA pro Probe ergab sich kein besseres Ergebnis im Vergleich zum Einsatz von 1 μ l DNA pro Probe, sodass wir, bei zusätzlich erheblich mehr Zeitaufwand und Mehrkosten, auf eine konstante DNA Konzentration verzichteten.

3.4 TaqMan SNP Genotypisierung

3.4.1 Vorbereiten der Reaktionsplatten

Aufbringen von je 1 μ l DNA der Frühgeborenen auf 384 well Platten. Proben bei Raumtemperatur trocknen lassen.

3.4.2 Prinzip der SNP Genotypisierung mit dem TaqMan

Der TaqMan SNP Genotyping Assay ist ein Verfahren zum Nachweis von SNP's. Das Ergebnis ist die Bestimmung von Wildtyp, homo- oder heterozygoten Varianten.

Der TaqMan arbeitet dabei nach dem Prinzip der allelischen Diskriminierung. Dies ist eine 5'-3'- *Exonuklease Reaktion*. Es werden spezielle Sonden eingesetzt, die aus einem Oligonukleotid bestehen, dessen 5'Ende mit einem Reporter- Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Dabei werden immer zwei Farbstoffe VIC (ein Patent der Firma Applied Biosystems) und FAM (Fluoreszein) eingesetzt. VIC detektiert Allel 1 und FAM Allel 2. Am 3'Ende der Sonde befindet sich ein Quencher-Farbstoff (ein Thiocyanidderivat). Zusätzlich zu dem jeweiligen Reporterfarbstoff ist an den Gensonden ein fluoreszenzauslöschender Farbstoff (non-fluorescent quencher = NFQ) mit minor groove binder (MGB) gebunden.

Wird die intakte Sonde bei einer Wellenlänge von 488nm angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen sog. Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt. Während der PCR bindet die Sonde spezifisch an die komplementäre Zielsequenz zwischen Forward- und Reverseprimer (Match). Die Sonden sind so konstruiert, dass die eine zu der dem Wildtyp entsprechenden DNA-Sequenz passt und die andere der Variante entspricht. Während der Synthese des Komplementärstranges wird durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der eingesetzten Polymerase die komplett hybridisierende Sonde gespalten. Freie, nicht hybridisierte Sonden und die Sonden des nicht vorhandenen Allels hybridisieren nicht (Mismatch) und werden nicht geschnitten, bleiben also intakt und tragen nicht zum Fluoreszenzsignal bei. Die Spaltung der Sonde bewirkt eine räumliche Trennung zwischen Reporter und Quencher und damit eine Unterbrechung der FET. Das führt, durch die Anregung bei 488nm des Reporterfarbstoffes, jetzt zu einem Fluoreszenzsignal (Emission). Die Emission für FAM liegt bei 518nm, die für VIC zwischen 500nm-600nm. Es erfolgt eine Endpunktmessung der entstandenen Fluoreszenzen am Ende der PCR. Entsprechend der Akku-

mulation von PCR-Produkten steigt die Fluoreszenz mit jedem PCR-Zyklus an. Wird dabei nur die Fluoreszenz eines Farbstoffes gemessen, handelt es sich um Homozygotie für das dem Farbstoff detektierende Allel. Können beide Fluoreszenzen gemessen werden liegt eine Heterozygotie vor, es werden also beide Allele exprimiert [107]. Siehe Abb. 3.1

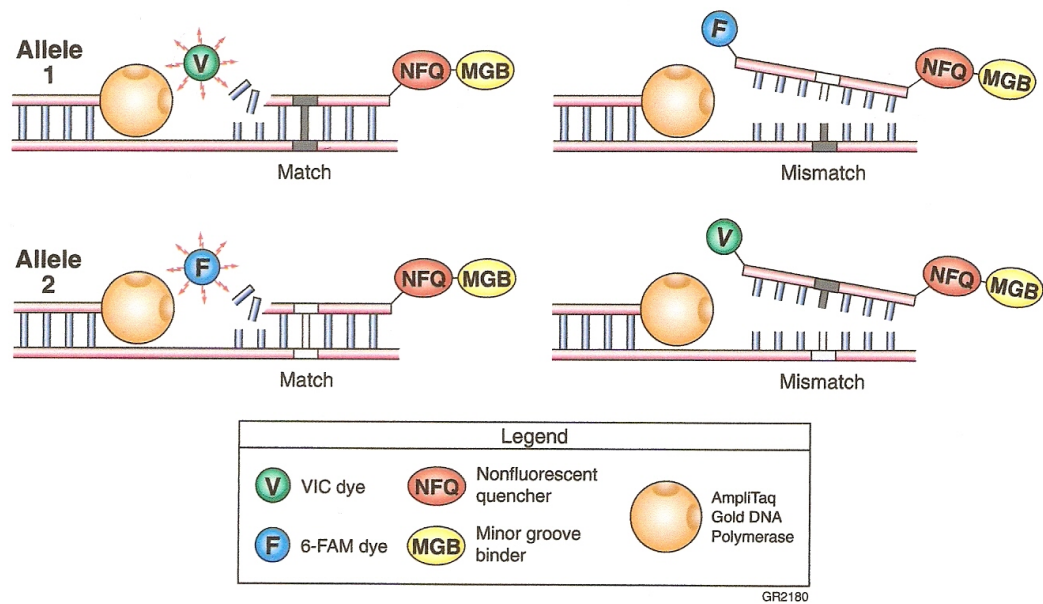


Abbildung 3.1: Prinzip der allelischen Diskriminierung mit dem TaqMan¹

Wir haben den TaqMan pre-designed SNP genotyping Assays, mit vorgefertigten Primern verwendet. Die unterschiedlichen Sequenzen lauten wie folgt:

rs4950928 CHI3L1 Chr.1 (1q32.1c) Forward

ATATACCTGTCCCCTCCACTCCCC[C/G]ACGCGGCAAACCAGCCCTTTTATGG

rs3923809 BTBD9 Chr.6 (6p21.2b) Forward

ATAAAATGATAGCTTTTCTCTCTTCT[A/G]TTTATCCATCTGCAATTCAGTAGGA

rs560887 G6PC2 Chr.2 (2q24.3f) Reverse

AGTGATCCAGTTTCTTTGCTTTTTTA[C/T]GCTTGTATCTATTCTTCCATCGTAG

¹Aus TaqMan SNP Genotyping Assay Protocol, Applied Biosystems, USA

rs1333049 Myokardinfarkt INK4 locus Chr.9 (9p21.3c) Forward CATAC-TAACCATATGATCAACAGTT[C/G]AAAAGCAGCCACTCGCAGAGGTAAG

Der Reaktionsansatz für eine Probe, besteht aus 2,5 μ l 2x TaqMan Universal PCR Master Mix Puffer, 0,0625 μ l, 40x SNP Genotyping Assay Mix und 2.4375 μ l DNase freiem Auqa dest. Der SNP Genotyping Assay Mix enthält die FAM bzw. VIC markierten Sonden, sowie die Primer; der Universal PCR Master Mix die für eine PCR benötigten Komponenten. Dies sind im einzelnen: AmpliTaq Gold DNA Polymerase, dNTP´s, Magnesiumchlorid und Pufferlösung. Zu jeder DNA Probe wurden 5 μ l Reaktionansatz geben. Zwischen jeder Mixaufnahme sollte man vortexen.

Die Platte wurde mit einer selbstklebenden Folie abgedeckt, zentrifugiert und die PCR durchgeführt. Dabei war zu beachten, dass die AmpliTaq Gold DNA Polymerase in inaktiver Form vorliegt. So können die Platten vorbereitet und dann einige Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden ohne dass es zur Anlagerung der Primer kommt. Das hat zur Folge, dass vor der eigentlichen PCR eine 10 minütige Enzymaktivierung erfolgen muss.

Für die PCR verwendeten wir sowohl den Thermal Cycler, Firma Thermo Hybaid, als auch den TaqMan ABI Prism 7900HT.

Die abschließende Fluoreszenzmessung erfolgt in beiden Fällen im TaqMan ABI Prism 7900HT. Zur Auswertung haben wir die SDS 2.2.2 Sequence Detector Software (Applied Biosystems, USA) verwendet.

Die gemessenen Werte werden in einem Allelplot (Punktwolke) dargestellt. Die SDS Software arbeitet mit dem proportionalen Anstieg des Fluoreszenzsignals während der PCR. Dabei gibt es zwei Möglichkeiten der Auswertung, eine Endpunktmessung und eine Quantifizierung. Die Endpunktmessung wird bei der allelischen Diskriminierung eingesetzt und gibt Auskunft darüber welches Fluoreszenzsignal entstanden ist, also eine qualitative Aussage über das Vorhandenseins eines Allels. Bei der Quantifizierung wird in jedem PCR-Zyklus der Fluoreszenzanstieg gemessen, sodass eine quantitative und qualitative Auswertung erfolgen kann.

Nach Anonymisierung der Mundschleimhautabstriche wurde die DNA-Isolierung und Verarbeitung räumlich getrennt von der TaqMan-Analyse durchgeführt, um Verunreinigungen zu vermeiden. Zusätzlich wurde auf jeder der

Temperatur	Zeit	Prozess	Zyklen
95°C	10 Minuten	Enzymaktivierung	
95°C	15 Sekunden	Denaturierung	45
60°C	1 Minute	Annealing + Elongation	

Tabelle 3.1: PCR Programm

384 well-Platten eine zufällige Anzahl Negativkontrollen, diese enthielten keine DNA, mitgeführt. Dies ist wichtig, da die PCR eine sehr spezifische und sehr sensitive Methode darstellt. Eine mögliche Kontamination durch Fremd-DNA würde zu einer falschen Genotypisierung und so zu falschen Ergebnissen führen. Es kommt zum vollständigen Verlust der Reliabilität und Validität der Untersuchung. Als weiteres Kontrollinstrument wurde eine zufällige Anzahl von Proben wiederholt aufgebracht und bestimmt.

3.5 Statistik

Die Polymorphismen wurde gemäß der oben formulierten Fragestellung mittels Chi-Quadrat-Test bzw. Mann-Whitney-U-Test untersucht. Alle p-Werte sind zweiseitig. Die als signifikant dargestellten Werte haben ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$. Kontinuierliche Variablen (Geburtsgewicht, Gestationsalter usw.) wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test untersucht, alle binären Variablen (Tod ja/nein, Therapie ja/nein etc.) wurden mit dem Chi-Quadrat-Test analysiert.

Eine Korrektur für multiples Testing führten wir nicht durch, da es sich um eine rein deskriptive Analyse handelt.

Nach Bestimmung der Genotypen führten wir retrospektiv eine Powerkalkulation für die 6 getesteten klinischen Endpunkt bzw. Therapien durch. Wir verwendeten dabei das Programm "PASS". Als erwartete Häufigkeiten der Komplikationen/ Therapien im Normalkollektiv wurde die Gesamthäufigkeit angenommen. Die Power wurde berechnet für eine erwartete Risikoerhöhung um mindestens 10% bei Kindern mit homozygoten alternativen Genotypen (Siehe Tabelle 8.1 auf Seite 52).

-

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Klinische Daten und Genotypen

Insgesamt wurden 2099 Frühgeborene vor 2009 mit einem Geburtsgewicht unter 1500g untersucht 4.1.

Knaben	1072 (51%)
Mehrlinge	666 (32%)
Gestationsalter (Wochen)	28,86 \pm 2,65
Geburtsgewicht (Gramm)	1077 \pm 291
Herkunft der Mutter	
Deutschland	1541 (74%)
Übriges Europa	215 (10%)
Naher Osten	221 (10%)
Asien	37 (2%)
Afrika	45 (2%)
Sonstige, nicht bekannt	40 (2%)

Tabelle 4.1: Übersicht klinische Daten von 2099 Frühgeborenen ¹

Als DNA -Quelle wurden Mundschleimhautabstriche verwendet. Deshalb erwarteten wir, in einem gewissen Prozentsatz keine erfolgreiche Genotypisierung durchführen zu können. Die Tabelle 4.2 gibt einen Überblick der Genotypen

¹Gestationsalter und Geburtsgewicht sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung, alle anderen Daten als Anzahl in %

Polymorphismus	Genotyp AA	Genotyp AB	Genotyp BB	nicht bestimmbar
rs3923809	AA n=905 (43%)	AG n= 763 (63%)	GG n=153 (7%)	N=278 (13%)
rs560887	TT n=1001 (48%)	TC n=760 (36%)	CC n=139 (7%)	N=199 (10%)
rs4950928	CC n=1202 (57%)	CG n=651 (31%)	GG n=67 (3%)	N=179 (9%)
rs1333049	GG n=529 (25%)	GC n= 1010 (48%)	CC n=409 (20%)	N=151 (7%)

Tabelle 4.2: Genotypverteilung

und die Rate an nicht erfolgreich analysierten Proben.

Da für einzelne Endpunkte (z.B. Insulintherapie, Beatmungszeit etc.) nicht von allen Frühgeborenen Information vorlagen, sind die genauen Fallzahlen der ausgewerteten Kinder und die relativen Prozente bezogen auf den jeweiligen Genotyp in den folgenden Ergebnistabellen angegeben.

4.2 Lungenerkrankungen

Der SNP rs4950928 in dem Chitinase 3 linke 1 Gen ist mit Asthma assoziiert, somit interessierte uns hier besonders die Atmung. Von 1917 untersuchten Kindern erhielten 1540 (80%) zusätzlichen Sauerstoff, 115 (6%) von ihnen auch noch bei Entlassung. Zwischen Frühgeborenen mit unterschiedlichen rs4950928 Genotypen finden sich keine statistisch signifikanten Differenzen in Bezug auf die Notwendigkeit einer Sauerstofftherapie, einer Versorgung mit Heimsauerstoff oder einer trachealen Beatmung. Siehe Tabelle 4.3.

Für die Bronchiopulmonale Dysplasie und die Notwendigkeit einer Dexamethasontherapie ergaben sich ebenfalls keine Unterschiede. 12% der homozygoten Risikoallelträger versus 14% der CC homozygoten Kinder entwickelten eine BPD. Für das Auftreten eines Pneumothorax ergab sich eine Differenz, bei allerdings sehr kleiner Fallzahl (10% versus 6%). Siehe Tabelle 4.4.

	CC	%	CG	%	GG	%	Ges.	%	p*
O ₂ Therapie	969	81	513	79	58	87	1540	80	0,248
O ₂ bei Entlassung	72	6	35	5	8	12	115	6	0,101
tracheale Beatmung	543	45	296	46	35	52	874	46	0,525

Tabelle 4.3: rs4950928, Sauerstofftherapie und Beatmung ²

	CC	%	CG	%	GG	%	Ges	%	p*
BPD	173	14	99	15	8	12	280	15	0,737
Dexamethason	53	4	36	6	5	8	94	5	0,348
Pneumothorax	73	6	24	4	6	10	103	5	0,039

Tabelle 4.4: rs4950928 und Erkrankungen ³

²*Chi Quadrat Test

³*Chi Quadrat Test

	AA	%	AG	%	GG	%	Ges	%	p*
Phenobarbital	59	8	52	8	10	8	121	8	0,963
Analeptika	595	80	488	79	93	76	1176	79	0,550

Tabelle 4.5: Therapie assoziiert mit rs3923809 ⁴

4.3 Neurologische Erkrankungen

Wie in der Einleitung bereits beschrieben ist es aus verschiedenen Gründen schwierig, Krampfanfälle bei Frühgeborenen zu diagnostizieren. Unter der Berücksichtigung, das mit PLM das Allel A (Allelfrequenz $A = 0,77$) des SNP rs3923809 im Intron des BTBD9 Gens assoziiert ist, stellten wir uns die Frage, ob bei den Frühgeborenen, die antikonvulsiv behandelt wurden, vermehrt das A Allel homozygot vorliegt. Für die Therapie mit Phenobarbital liegen uns Daten von 1485 Frühgeborenen vor. In dieser Gruppe sind 59 (8%) AA homozygote versus 10 (8%) GG homozygote Kinder therapiert worden. Siehe Tabelle 4.5. Von Stefansson [74] wurde beschrieben, dass bei AA homozygoten Patienten 4 mal mehr Limb Movements pro Stunde auftreten als bei GG homozygoten. In Bezug auf Frühgeborene könnte dies mehr Aktivität, mehr „Fitness“ bedeuten. Dagegen sprechen die Zahlen in Tabelle 4.5. Sie zeigt, dass von 1487 Frühgeborenen, von denen wir ein Ergebnis zur analeptischen Therapie haben, 1176 atemstimulierend behandelt worden sind. Davon sind 595 (80%) homozygot für das Risikoallel A und 93 (76%) GG homozygot. Erkennbar ist, dass alle Kinder, egal welchen BTBD9 Genotyp sie besitzen, häufig analeptisch behandelt wurden.

⁴*Chi Quadrat Test

4.4 Glucosestoffwechsel

Das A Allel des SNP rs560887 senkt das Hyperglykämierisiko. Für unsere Analysen wurde eine Reverse-Sequenz verwendet, sodass hier das Allel des Interesses das T Allel ist.

Das T Allel hat in unseren Untersuchungen keinen entscheidenden Einfluss auf das Outcome der Kinder. Tendenziell sind, von den 1897 Frühgeborenen zu denen es Ergebnisse für eine Insulintherapie gibt, sogar etwas weniger CC homozygote Kinder mit Insulin behandelt worden als TT homozygote, 3,6% versus 6,2%. Im Gegensatz dazu tendierten diese Kinder zu Hirnblutungen. 23,0% versus 18%, von 1896 untersuchten Frühgeborenen. Die Mortalität ist bei allen Genotypen in etwa gleich hoch, im Mittel 3,1% bei 1896 dazu analysierten Frühgeborenen. Hierzu ist anzumerken, dass wir nur sehr wenige CC homozygote Kinder untersuchen konnten (Tabelle 4.7).

Wie von Kao und Blanco beschrieben, ergab sich auch in unseren Untersuchungen kein Zusammenhang mit dem Geburtsgewicht [84, 85]. Die Kinder wiesen ein durchschnittliches Geburtsgewicht von 1081,7g auf. TT homozygote im Mittel 1083g, SD = 291g und CC homozygote 1090g mit einer SD von 296g. Im Hinblick auf den Einfluss des Glucosestoffwechsels auf das Wachstum der Kinder konnte ebenfalls keine Differenz belegt werden. Für alle Genotypen fand sich eine Gewichtszunahme von ca. 21g pro Tag, SD = 5,1g pro Tag (Tabelle 4.6).

	TT	TC	CC	Ges.	p*
Gestationsalter (Wochen)	28,9 ± 2,6 n=1001	28,8 ± 2,7 n=760	29,0 ± 2,8 n=139	28,9 ± 2,6 n=1900	0,705
Geburtsgewicht (Gramm)	1083 ± 291 n=1001	1072 ± 291 n=760	1090 ± 296 n=139	1079 ± 291 n=1900	0,646
Gewichtszunahme (Gramm/d)	20,8 ± 5,4 n=978	20,9 ± 5,1 n=743	21,0 ± 4,8 n=136	20,8 ± 5,2 n=1857	0,917

Tabelle 4.6: rs560887 und postnatale Gewichtszunahme ⁵

⁵Alle Daten sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung, n ausgewertete Fälle; * Kruskal-Wallis-Test

⁶*Chi Quadrat Test

	TT	%	CT	%	CC	%	Ges	%	p*
Insulin Therapie	62	6,2	42	5,5	5	3,6	109	5,7	0,437
IVH	180	18,0	133	17,6	32	23,0	345	18,2	0,301
Tod	32	3,2	19	2,5	5	3,6	56	3,0	0,611

Tabelle 4.7: Hoher Glucosespiegel, G6PC2 und Komplikationen ⁶

4.5 Gefäßkrankungen

Das C Allel des SNP rs1333049 führt zu Gefäßveränderungen [88, 89], wenn daraus eine Plazentainsuffizienz folgt, müssten CC homozygote Kinder ein niedrigeres Geburtsgewicht und eventuell ein geringeres Gestationsalter aufweisen als die GG homozygoten bzw. heterozygote Kinder. Unsere Analyse unterstützt diese Hypothese nicht. Die Kinder weisen ein Gestationsalter von ca. 29 Wochen und ein Geburtsgewicht von durchschnittlich 1076g auf (Tabelle 4.8). 529 GG homozygote Frühgeborene sind durchschnittlich in der 29,1 Gestationswoche geboren, SD = 2,6 Wochen und haben ein Geburtsgewicht von 1082g, SD = 290g. Die 409 CC homozygoten Frühgeborenen sind durchschnittlich in der 28,8 Woche, SD = 2,7 Wochen und mit einem Gewicht von 1070g, SD = 296g, geboren worden. Die jeweils ähnlichen SD sprechen für eine homogene Verteilung. Es sind nicht mehr Todesfälle bei den Frühgeborenen zu verzeichnen, die das Risikoallel C tragen. Wir konnten insgesamt 1948 analysieren, davon waren 529 GG homozygot. 15 von ihnen (3%) starben. Von den 409 CC homozygoten starben 11 (3%) Siehe Tabelle 4.8.

Ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ergaben sich in der Häufigkeit des Auftretens von weiteren gefäßbedingten Erkrankungen. Einzig ein etwas häufigeres Auftreten von Hirnblutungen bei CC homozygoten (21%) Kindern gegenüber GG homozygoten (18%), bei 1948 untersuchten Kindern. Diese Werte sind als nicht signifikant zu beurteilen. Eine Ligatur des PDA haben 25 (5%) GG homozygoten Kindern erhalten, 23 (6%) der CC homozygoten ebenfalls. 21 (4%) GG homozygote Kinder versus 16 (4%) CC homozygote Kinder von 1907 Frühgeborene erhielten eine Kryo- oder Lasertherapie ihrer ROP. Siehe Tabelle 4.8. Diese Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

⁶Gestationsalter und Geburtsgewicht sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung, n ausgewertete Fälle, alle anderen Variablen als Anzahl in % der von der jeweiligen

	GG	GC	CC	Ges.	p*
Gestationsalter Wochen	29,1 ± 2,6 n=529	28,8 ± 2,7 n=1010	28,8 ± 2,7 n= 409	28,9 ± 2,6 n=1948	0,094
Geburtsgewicht Gramm	1082 ± 290 n= 529	1077 ± 292 n=1010	1070 ± 296 n=409	1079 ± 291 n=1948	0,846
Hirnblutungen (n/%)	93/18%	171/17%	86/21%	350/18%	0,193
Operation eines PDA (n/%)	25/5%	60/6%	23/6%	108/6%	0,616
Operation einer ROP (n/%)	21/4%	43/4%	16/4%	80/4%	0,944
Tod (n/%)	15/3	29/3	11/3	55/3	0,981

Tabelle 4.8: rs1333049 und potentiell mit Gefäßerkrankungen assoziierte Komplikationen bei Frühgeborenen ⁸

Komplikation betroffenen Kinder mit dem in der Spalte angegebenen Genotyp. * Kruskal-Wallis-Test für Gestationsalter und Geburtsgewicht, Chi-Quadrat für alle übrigen Variablen

Kapitel 5

Diskussion

Auf Grund der immer noch sehr hohen Morbidität und Mortalität sollte mit dieser Arbeit nach Ursachen für Erkrankungen der Frühgeborenen gesucht werden.

Die Inzidenz der Frühgeburtlichkeit variiert in den unterschiedlichen ethnischen Gruppen. So haben besonders farbige Frauen, aber auch Lateinamerikanerinnen und Asiatinnen, laut Statistiken aus den USA und England, ein erhöhtes Frühgeburtenrisiko [4, 108]. Das gibt einen Hinweis auf mögliche genetische Ursachen. So entstand die Idee, zu überprüfen, inwieweit genetische Polymorphismen, die für Erkrankungen Erwachsener beschrieben sind ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung spezifischer Erkrankungen Frühgeborener spielen. Wir wählten die damals wesentlichen bekannten SNPs für unsere Untersuchungen aus. Dabei ist wichtig zu wissen, dass SNPs unterschiedliche Folgen haben können. Sie können, z.B. durch den Austausch einer Aminosäure, das Gen bzw. das Genprodukt stark beeinflussen. Dies kann, bei einer großen Penetranz, zu Krankheiten führen. Hierbei handelt es sich um die klassische Punktmutation. Andere SNPs haben einen geringeren funktionellen Effekt. Sie prädisponieren, zusammen mit weiteren genetischen Eigenschaften und Umwelteinflüssen, für bestimmte Erkrankungen. Wenn diese SNPs in einer Population stark verbreitet sind, können sie von besonderer Bedeutung sein, wenn sie mit multifaktoriell bedingten Erkrankungen wie Diabetes mellitus, KHK, Asthma u.a., assoziiert sind [109, 110, 111]. Es existieren aber auch einflusslose SNPs. Um sicher zu sein, dass ein funktioneller SNP eine pathologische

Wirkung hat, muss man seine Funktion auf Proteinebene nachweisen. Dies ist oft schwierig, besonders wenn kodierende SNPs für den einzigen beeinflussenden Faktor einer multigenetischen Erkrankung gehalten werden [112]. Mögliche Effekte funktioneller SNPs auf die Transskription, das Splicing und die Transkriptstabilität in nicht kodierenden, regulatorischen DNA-Abschnitten (Promotorregionen, Introns, Transkriptionsfaktorbindungsstellen) sind mit heutigen Methoden kaum nachzuweisen [113].

Zur Überprüfung eines Zusammenhanges zwischen den beschriebenen Polymorphismen und dem Auftreten von Erkrankungen nutzten wir eine Assoziationsstudie. Assoziationsstudien bieten einige Vorteile, allerdings ergeben sich oft falsch positive Ergebnisse durch eine zu geringe Fallzahl, nicht gut korrelierte Kontrollgruppen, keine Überprüfung der Ergebnisse an einem zweiten Fall-Kontroll-Kollektiv und eine nicht ausreichende Begründung der Ausgangshypothese u.a.m. [114]. Essentiell ist weiterhin eine klar definierte Risikogruppe. Letzteres wird gerade von dem Kollektiv der Frühgeborenen gut erfüllt, da alle diese Kinder intensivmedizinisch betreut werden und somit wichtige Ereignisse standardisiert erfasst werden. Ein weiterer Vorteil dieses Kollektivs ist, dass die einzelnen spezifischen Erkrankungen gut definiert sind. Als Kontrollgruppe gelten jeweils die von einer Erkrankung nicht betroffenen Frühgeborenen. Zur Erreichung einer repräsentativen Fallzahl war es notwendig, eine möglichst große Zahl neonatologischer Zentren mit einzubeziehen.

In der retrospektiv durchgeführten Powerkalkulation konnten wir, mit einer Ausnahme- rs4950928, zeigen, dass die Negativaussage, also dass die von uns untersuchten "Risikoallele" kein Risiko darstellen, ausreichend sicher ist. Dies gilt allerdings nur für die Annahme, dass die Differenz zwischen den alternativen Genotypen 10% beträgt (Siehe Tabelle 8.1 auf Seite 52). Die Power sollte $> 0,8$ sein, d.h. für den SNP rs4950928 hätten wir mehr Kinder untersuchen müssen um eine ausreichende Power zu erreichen.

Auf der Grundlage der beschriebenen SNPs für Erkrankungen Erwachsener führten wir molekulargenetische Untersuchungen genomischer Frühgeborenen-DNA durch.

Herkömmliche Verfahren zum Nachweis von PCR-Produkten, wie Southern blot oder Restriktionsenzymverdau, schließen sich der PCR an und sind zudem

sehr zeit- und arbeitsintensiv. Hinzu kommt die Gefahr der Kontamination und der Probenverwechslung bei jedem Arbeitsschritt. Der TaqMan bietet den Vorteil Amplifikation und Nachweis der PCR-Produkte gleichzeitig (real time) und in einem Reaktionsgefäß durchzuführen. Weitere Vorteile des Systems sind der hohe Probendurchsatz und die Möglichkeit zur automatischen Quantifizierung der Proben.

Für den korrekten Ablauf und eine hohe Spezifität der Analyse ist eine stabile und sequenzspezifische Bindung der Sonde an die Matrix-DNA essentiell. Siehe 3.4.1. Um das zu gewährleisten ist es sinnvoll beim Sondendesign einige Punkte zu beachten. Der CG-Gehalt sollte zwischen 40-60% liegen, die Sonde sollte nicht mehr als drei Nukleotide eines Typs hintereinander aufweisen und es sollte keine Komplementarität zu den PCR-Primern bestehen. Für eine optimale Spezifität der Sonde wählt man deren Länge zwischen 24-30 Nukleotiden. Sonden, die länger als 35 Nukleotiden sind, können durch Sekundärstrukturbildung Probleme bei der Hybridisierung machen.

Unsere Sonden weisen an einigen Stellen Folgen gleicher Nukleotide auf, die >3 sind, dies ist vertretbar, da besonders Poly-G-Bereiche zu vermeiden sind.

Trotz einer statistisch genügend großen Zahl untersuchter Kinder, überlegter Auswahl der modernen, effektiven Methode und zuverlässiger Laborarbeit konnten unsere theoretischen Ansätze nicht bestätigt werden.

5.1 Lungenerkrankungen

Verschiedene Arbeiten zeigten, dass Kinder mit BPD und Asthma ähnliche Symptome haben[57, 58, 59, 60, 61, 62, 64]. Im Rahmen dieser Arbeit prüften wir, ob ein für Asthma prädisponierender SNP auch gehäuft bei Frühgeborenen mit BPD nachzuweisen ist und so eine gemeinsame genetische Grundlage dieser Erkrankungen angenommen werden kann. Unsere Ergebnisse sprechen dagegen.

Die Prävalenz von Asthma ist bei Kindern und Erwachsenen zwei bis dreimal geringer als die von bronchialer Hyperreagibilität [115]. Obwohl Carol Ober et al. [39] zeigen konnten, dass der SNP rs4950928 mit erhöhten YKL-40 Serumwerten, Asthma und bronchialer Hyperreagibilität assoziiert ist und die Patienten mit Asthma erhöhte YKL-40 Serumwerte aufweisen, können für die

BPD völlig andere Mechanismen von Bedeutung sein. Zum einen sind die erhöhten Serumwerte für YKL-40 bei Patienten mit *Chronisch Obstruktiver Lungenerkrankung*, *Rheumathoider Arthritis* und verschiedenen Krebserkrankungen [40, 41, 42] nachzuweisen und zum anderen scheint, wie oben erwähnt, Asthma pathophysiologisch nicht gleich bronchialer Hyperreagibilität zu sein. Die Idee YKL-40 Level als Biomarker für BPD einzusetzen musste deshalb ebenfalls verworfen werden. Allerdings berichten die Autoren von einer Querschnittsstudie an 1071 Kindern und jungen Erwachsenen, im Alter zwischen 3 und 22 Jahren mit Asthma, dass ein Screening für rs4950928 asthmabedingte Krankenhausaufenthalte vorhersagen und durch dann individuell erstellte Therapiepläne die Kosten für das Gesundheitswesen gesenkt werden können. Sie konnten zeigen, dass das minor-131G Allel des SNP rs4950928 vor asthmabedingten Krankenhausaufenthalten schützt [116]. Die Ursachen der BPD müssen nicht im weitesten Sinne im entzündlichen Bereich liegen. Hadchou et al. konnten Variationen im SPOCK2 Gen, rs1245560 und in der kaukasischen Population auch rs1049269, eine Assoziation mit BPD nachweisen. Das SPOCK2 Gen scheint eine wichtige Rolle in der Alveolarisierung zu spielen und könnte so für BPD prädisponieren [117]. Dies impliziert, dass nicht die Entzündung sondern die Entwicklung der Lunge und daran beteiligte Gene bei einer zu frühen Geburt für die BPD prädisponieren. Dafür sprechen die Ergebnisse von Krueger et al., die zeigen, dass IL18, ein wichtiges immunologisches Zytokin, keine Rolle in der Entstehung der BPD spielt [118]. Wiederum im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Mailaparambil et al.. Sie konnten eine Assoziation zwischen SNPs des Tumor Nekrose-Faktor-alpha, Toll-Like-Rezeptor-10 und dem Vascular-Endothelial-Growth-Factor und der Entstehung einer BPD nachweisen [119]. Sie spielen alle eine Rolle im Immunsystem. Die *Toll-like Rezeptor Proteinfamilie* (TLR) fördert wahrscheinlich die pulmonale Clearance, reguliert Entzündungsreaktionen und erleichtert das Epithelwachstum in der Lunge. So vermuteten Sampath et al., dass Polymorphismen in den TLR-Signalwegen die Prädisposition bzw. den Schweregrad der BPD beeinflussen. Sie fanden eine Assoziation zwischen der TIRAP (g.2054C>T) Variante und BPD sowie zwischen der TLR5 (g.1174C>T) Variante, die für das Stop-Codon (R392X) codiert und schwerer BPD [120].

5.2 Krampfanfälle

Wie eingangs berichtet, ist es schwierig zu entscheiden welche Bewegungsphänomene der Frühgeborenen Krampfanfälle darstellen. Neonatale Anfälle können als tonische Bewegungen, als Myoklonien oder Kloni auftreten. Spezifisch für Neugeborene sind jedoch subtile Anfälle, die orale (Schmatzen, Schlucken) und okuläre Phänomene (Bulbusbewegungen, Nystagmus), komplexe Bewegungsmuster oder Schluckauf beinhalten können. Frühgeborene zeigen oft abrupte Bewegungsmuster, wodurch die klinische Einteilung in epileptische oder nicht epileptische Phänomene oft nicht möglich ist und es so zu Fehlinterpretationen kommt [121]. Die weitaus häufigeren symptomatischen Krämpfe müssen ebenfalls berücksichtigt und abgegrenzt werden, wobei es hier aufgrund von weiteren klinischen Ergebnissen leichter fällt die Phänomene zuzuordnen. Die sich daraus ergebene Hypothese, es könnte sich bei den Bewegungsphänomenen der Frühgeborenen um eine frühe Form des RLS oder PLM handeln, konnten wir nicht bestätigen. Das A Allel des rs3923809 SNPs das mit PLM in sleep assoziiert ist, ist nicht mit Krampfanfällen bei Frühgeborenen assoziiert, da 8,0% AA homozygote versus 8,2% GG homozygote Kinder mit Phenobarbital therapiert wurden, siehe Tabelle 4.5. Man kann zu diesem Zeitpunkt also davon ausgehen, dass das RLS keine genetische Gemeinsamkeit über o.g. SNP mit neonatalen Krampfanfällen hat. In neueren Studien wurden nur Assoziationen zwischen dem BTBD9 Gen und dem Tourette-Syndrom sowie zwischen dem Auftreten eines RLS im Endstadium von Nierenerkrankungen nachgewiesen [122, 123]. So wird bis zur Klärung, welche Kinder unter welcher Art Bewegungsphänomenen leiden, weiter antikonvulsiv behandelt. Eine andere Arbeit sollte klären, was den Bewegungsphänomenen wirklich zu Grunde liegt und wie diese sinnvoll therapiert werden können. Die Hoffnung, dass aus unseren Ergebnissen mit einer möglichen Assoziation zwischen dem A Allel und neonatalen Krämpfen eine neue Therapieoption entsteht, mussten wir aufgeben. Nach unserer Vorstellung hätten weitere Untersuchungen der AA homozygoten Kindern mit neonatalen Krampfanfällen in verschiedenen Altersstufen ein RLS bzw. PLM ergeben und so die Sichtweise auf Krampfanfälle bei Frühgeborenen verändert, was möglicherweise zu anderen Therapien geführt hätte.

Verschiedene Gene der KCNQ Familie codieren für Kaliumkanalunterein-

heiten. Speziell KCNQ2 und KCNQ3 reduzieren den Ionenstrom in der Zelle, wodurch sie eine wichtige Rolle bei *benignen familiären neonatalen Krampfanfällen* spielen. Goldberg-Stern et al. fanden eine neue Mutation im KCNQ2 Gen, c.63-66delGGTG (p.K21fsX40), die einen frame-shift verursacht. Diese Mutation konnte bei Patienten mit *familiärereren neonatalen Krampfanfällen* nachgewiesen werden. Die Krämpfe traten nach der Neonatalperiode nicht wieder auf. Diese Mutation hat für die Autoren Auswirkungen auf die Diagnose, die Prognose und die Therapie neonataler Krampfanfälle [124]. Man könnte versuchen diese Mutation an den Frühgeborenen mit Krämpfen nachzuweisen, auch wenn diese familiären neonatalen Krampfanfälle eine seltene autosomal-dominant vererbte Epilepsieform Neugeborener darstellen.

Zu überlegen ist, ob man die AA homozygoten Kinder in Zukunft auf PLM und RLS untersucht und so die Studie von Stefansson bestätigen kann. Dazu sollte man die betroffenen Frühgeborenen im Alter zwischen 8 und 17 Jahren und ggf. in höherem Lebensalter nochmal befragen und untersuchen, da die Prävalenz des RLS mit zunehmendem Alter steigt. Als Kontrollgruppe könnten dabei die heterozygoten und die GG homozygoten Kinder dienen.

5.3 Glucosestoffwechsel

Hyperglykämien erhöhen bei Frühgeborenen Morbidität und Mortalität. Aus diesem Grund ist es von Bedeutung die Ursachen für Hyperglykämien zu kennen, die bis heute nicht genau geklärt sind. Möglich ist eine inadäquate Insulinantwort auf Grund einer gestörten Proinsulinproduktion der beta-Zellen des Pankreas bei ELBW Kindern [125]. Auch eine Insulinresistenz, wie eingangs beschrieben, scheint an den Hyperglykämien der Frühgeborenen beteiligt zu sein. Das A Allel (hier T Allel) des SNP rs560887 reduziert das Hyperglykämierisiko und ist assoziiert mit verminderten nüchtern Plasmaglucosewerten 1.1.3. Hier konnten wir keinen Unterschied zwischen den Genotypen und der Häufigkeit von Insulintherapie nachweisen. 6,2 % der TT homozygoten versus 3,6% der CC homozygoten Kinder erhielten Insulin.

Daraus ergibt sich, dass das A Allel des Polymorphismus, rs560887, das bei Erwachsenen für niedrigere nüchtern Plasmaglucosewerte und ein vermindertes Hyperglykämierisiko sorgt, keinen Einfluß auf die Hyperglykämien Frühgebo-

rener hat. Für genetische bedingte Diabetes Formen wie den *transienten* oder *permanenten neonatalen Diabetes mellitus* allerdings fanden sich Variationen z.B. im KCNJ11 Gen [126]. Für Frühgeborene konnte man jüngst feststellen, dass ihre zu frühe Geburt mit verringerter Insulinsensitivität assoziiert ist. Bei Kindern mit geringem Geburtsgewicht liegt im Vergleich eine inverse Assoziation zur Insulinsensitivität und beta-Zellfunktion vor [127]. Die beta-Zellen Proliferation des Pankreas scheint altersabhängig zu sein. Das zeigen die jüngst veröffentlichten Ergebnisse von Chen et al.. Mit dem Alter fällt in den beta-Zellen des Pankreas die *platelet-derived growth factor receptor* (Pdgfr) Konzentration, was zu einer reduzierten Replikation führt. Bei Mäusen verhindert diese altersabhängige Veränderung die neonatale beta-Zell Expression und in der erwachsenen Maus die beta-Zell Regeneration. Bei Erwachsenen fehlt also das Signal des Pdgfr. Durch die Einwirkung von Pdgfr-AA in den jungen Inselzellen werden die beta-Zellen des Pankreas stimuliert [128]. Aus diesen Beobachtungen könnte sich ein neuer Hinweis für die Entstehung von Hyperglykämien bei Frühgeborenen ergeben. Vielleicht wird in ihren beta-Zellen aufgrund der Unreife noch zu wenig Pdgfr exprimiert. Eine andere Ursache könnte in der Leber liegen. Der *orphan nuclear receptor* LRH-1 (oder auch NR5A2 genannt), reguliert die Gallensäurebiosynthese. Als Ligand konnte Dilauroyl Phosphodicholin (DLPC) nachgewiesen werden. DLPC induziert bei Mäusen Enzyme der Gallensäurebiosynthese in der Leber, erhöht deren Konzentration und verringert die hepatischen Triglyceride sowie die Serumglucose [129].

5.4 Gefäßkrankungen

Der SNP rs1333049 ist über die Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitoren CDKN2A und CDKN2B an der Regulation des Zellzyklus und über TGF-beta an der Proliferation und Differenzierung vieler Zellen sowie der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt. Die in dieser Arbeit erwähnten Gefäßkrankungen sind multifaktoriell bedingt und bei den meisten ist die genaue Pathogenese noch unbekannt. Vor diesem Hintergrund entstand die Vermutung, dass an der Entstehung dieser Erkrankungen der SNP rs1333049 beteiligt sein könnte. Unsere Ergebnisse bestätigen die Überlegungen einer Beteiligung des SNP rs1333049 nicht. Es ergaben sich zwischen den verschiedenen Genotypen keine Unter-

schiede.

Allenfalls bei der IVH könnte man eine Tendenz erkennen. Hier hatten 16,1% GG homozygote Frühgeborene eine IVH und 20,8% der CC homozygoten, diese Tendenz ist nicht statistisch signifikant. Eine chronische Plazentainsuffizienz ist letztlich auf Gefäßveränderungen zurückzuführen. Sie hat nicht nur Einfluß auf das fetale Wachstum sondern führt z.T. zur iatrogenen Frühgeburt. Wenn als Ursache der Insuffizienz eine Proliferationsstörung unter Beteiligung des SNP rs1333049 vorliegt, sollten die CC homozygoten Kinder ein geringeres Gestationsalter und ein geringeres Geburtsgewicht aufweisen. Tatsächlich ergaben sich diesbezüglich keine Diskrepanzen. Die GG homozygoten Kinder kamen mit 29,9 Wochen (SD 2,5 Wochen) und einem Gewicht von 1078,48g (SD 295,7g) zur Welt, die CC homozygoten mit durchschnittlich 28,7 Wochen (SD 2,7 Wochen) und einem Gewicht von 1049,81g (SD 287,5g). Für IVH konnte eine Assoziation zwischen einer Faktor V Leiden Mutation, rs6025 (A Allel) und IVH Grad I und II erarbeitet werden [130]. Eine Ursache im Gerinnungssystem, nicht in den Gefäßen selber.

In der Zusammenschau fehlt bei Frühgeborenen die Relevanz der Risikofaktoren die bei Erwachsenen gefunden wurden. Zum einen kann dies bedeuten, dass nicht die richtigen bei Erwachsenen detektierenden Risikofaktoren untersucht wurden, sodass es sich lohnen könnte weitere Polymorphismen zu untersuchen. Zum anderen scheint eine genomweite Analyse bei Frühgeborenen mit spezifischen Erkrankungen wesentlich erfolgversprechender.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Jedes 10. Kind wird in Deutschland zu früh geboren. Frühgeburt stellt, trotz enormer Fortschritte in der neonatalen Intensivmedizin, die Hauptursache für Morbidität und Mortalität im Kindesalter dar. Bis heute sind die genauen Ursachen spezieller, schwerer Erkrankungen Frühgeborener nicht ausreichend geklärt. Mit dieser Arbeit hofften wir genetische Risikofaktoren für bestimmte Erkrankungen Frühgeborener zu identifizieren. Bei den untersuchten Polymorphismen handelt es sich um bekannte Risikofaktoren für Erkrankungen Erwachsener. Wir prüften deshalb die Hypothese, dass diese genetischen Risikofaktoren auch bei Frühgeborenen mit dem Auftreten von Komplikationen assoziiert sind, für die ein ähnlicher Pathomechanismus wie beim Erwachsenen vermutet werden konnte. Im einzelnen handelt es sich um:

rs4950928 CHI3L1 Chr.1 (1q32.1c) - Asthma/ BPD

rs3923809 BTBD9 Chr.6 (6p21.2b) - RLS,PLM/ neonatale Krampfanfälle

rs5608887 G6PC2 Chr.2 (2q24.3f) - hohe Plasmaglukosewerte/ neonatale Hyperglykämien

rs1333049 INK4 Chr.9 (9p21.3c) - Myokardinfarkt/ Gefäßerkrankungen

Um bei den multifaktoriell bedingten Erkrankungen einen Zusammenhang zwischen den entsprechenden genetischen Variationen und dem Auftreten der beschriebenen Erkrankungen zu überprüfen, nutzten wir eine Assoziationsstudie. Untersucht wurden DNA-Proben aus Mundschleimhautabstrichen von Frühgeborenen. Zur SNP Genotypisierung nutzten wir das TaqMan-Verfahren. Grundlage für die Untersuchung der Asthma assoziierten SNPs in Bezug auf die BPD waren Beschreibungen, dass Kinder mit einer BPD später ähnliche

Symptome zeigen wie Kinder mit Asthma. Unsere Ergebnisse ergaben keine Assoziation zwischen rs4950928 und BPD. Man sollte also trotz der Gemeinsamkeiten von einer unterschiedlichen Pathophysiologie ausgehen. Krampfanfälle sind aus verschiedenen Gründen bei Frühgeborenen schwierig zu diagnostizieren und zuzuordnen, so erschien es uns interessant zu überprüfen, ob den Bewegungsphänomenen der Frühgeborenen eine Frühform des RLS und/oder PLM zugrunde liegen könnte. Anlass dazu gab eine Studie in der das A Allel des SNP rs3923809 mit PLM in sleep assoziiert ist. In dieser Arbeit ist es aber nicht mit neonatalen Krampfanfällen vergesellschaftet. Besonders Hyperglykämien, die bei Frühgeborenen sehr häufig vorkommen, erhöhen Morbidität und Mortalität, sodass wir genetischen Ursachen analysierten. Das A Allel des SNP rs560887 reduziert das Hyperglykämierisiko und ist mit niedrigeren Plasmaglucosewerten assoziiert. Zu erwarten wäre gewesen, dass die GG homozygoten Kinder, in unserer Arbeit CC homozygoten (reverse Sonde), vermehrt mit Insulin therapiert wurden, da ihnen die protektive Wirkung des A Alleles fehlt. Nachzuweisen war kein Unterschied in der Häufigkeit einer Insulintherapie zwischen den einzelnen Genotypen. Das A Allel des Polymorphismus rs560887, das bei Erwachsenen für niedrigere nüchtern Plasmaglucosewerte und ein vermindertes Hyperglykämierisiko sorgt, hat keinen Einfluß auf Hyperglykämien bei Frühgeborenen. Die hier untersuchten Gefäßerkrankungen, IVH und Plazentalösung sind multifaktoriell bedingt und ihre genaue Pathogenese nicht ausreichend geklärt. Der SNP rs1333049 ist an der Regulation des Zellzyklus, an der Proliferation und der Differenzierung vieler Zellen, sowie an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt. Diese Feststellung ließ uns vermuten, dass dieser Polymorphismus auch in Zusammenhang mit Gefäßerkrankungen Frühgeborener stehen könnte. Allerdings ergab sich für keine der Erkrankungen eine Assoziation mit dem SNP rs1333049.

Zusammenfassend steht keiner der untersuchten Polymorphismen für Erkrankungen Erwachsener im Zusammenhang mit Erkrankungen Frühgeborener.

Kapitel 7

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. E. Herting für die Möglichkeit in der Klinik für Kinder und Jugendmedizin meine Doktorarbeit erstellen zu können.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. W. Göpel für die Idee zu dieser Arbeit, die verständnisvolle Betreuung und die Hilfestellung.

Ebenfalls herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. H. Schunkert und Frau Prof. Dr. rer. nat. J. Erdmann aus der Medizinischen Klinik II für die Nutzung des TaqMan ABI Prism 7900HT, sowie bei Frau P. Bruse für die hervorragende Unterstützung bei den Messungen und deren Auswertung. Bei Frau S. Ziesenitz möchte ich mich herzlich für die Hilfe im Labor bedanken und Frau Birgit Roenspiess, sowie bei Frau Sabine Brehm für die Dokumentation der klinischen Daten und für die Nutzung der Datenbank. Ganz besonders möchte ich mich bei den vielen Eltern der Frühgeborenen bedanken, die es erst ermöglicht haben diese Untersuchungen durchzuführen. Dies gilt natürlich auch für die Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen der beteiligten Zentren, ohne deren Hilfe wir nicht so viele DNA Proben hätten zusammentragen können.

An meinen Cousin A. Ellenberg geht ein besonderer Dank für die geduldige Unterstützung und Hilfe bei Computerproblemen. Für den Rückhalt und die Motivation möchte ich meinem Mann, Jan O. Petersen danken.

Abschließend danke ich ganz herzlich meinen Eltern, Evelin und Manfred Ellenberg, ohne deren Unterstützung das Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Kapitel 8

Anhang

SNP	Erkrankung	Erwartete Häufigkeit der Erkrankung / Therapie im Normkollektiv	Erwartete Häufigkeit der Erkrankung im Risikokollektiv	Zahl Normkollektiv*	Anzahl Risikokollektiv*	Power
rs4950928	Sauerstoff	80%	90%	1202	67	0,53
	BPD	15%	25%	1202	67	0,58
rs3923809	Phenobarbital	8%	18%	905	153	0,94
rs560887	Insulin	5%	15%	1001	139	0,97
rs1333049	Hirnblutung	18%	28%	529	409	0,95
	ROP	4%	14%	529	409	0,99

Tabelle 8.1: Poweranalyse ¹

¹*Berechnet wurde jeweils der homozygote Wildtyp vs. homozygoter alternativer Genotyp. Für die Powerberechnung wurde eine absolute Differenz von 10% als klinisch relevant angesehen, 2-seitige Testung, alpha-Fehler 0,05

Einverständniserklärung

Einverständniserklärung

Hiermit erkläre ich/wir mein/unser Einverständnis zur Untersuchung meiner Mundschleimhautproben und der meines(r)/unseres(r) Kindes(r)

_____ geb. am _____

auf genetische Polymorphismen. Ich bin darüber aufgeklärt und einverstanden, dass die klinischen Verlaufsdaten meines Kindes weitergeleitet werden und dass die entnommenen Mundschleimhautproben ausschließlich in anonymisierter Form zur Erforschung von Risikofaktoren für Erkrankungen des Frühgeborenen und Frühgeburtlichkeit genutzt werden. Ich bin darüber informiert, dass aufgrund der anonymisierten Probenverarbeitung eine Befundmitteilung weder an mich noch an die mein Kind behandelnden Ärzte erfolgen kann.

Ort, Datum

Unterschrift des/der Erziehungsberechtigten

Abbildung 8.1: Einverständniserklärung

Aufklärungsbogen

Aufklärungsbogen für Eltern Frühgeborener

Liebe Eltern,

Ihr Kind wurde mit einem Geburtsgewicht unter 1500 Gramm und weit vor dem errechneten Geburtstermin geboren. Trotz intensiver Forschung weiß man immer noch sehr wenig über die Ursachen von Frühgeburtlichkeit. Nach der Geburt benötigen manche Frühgeborene sehr viel mehr technische Hilfe (Beatmung etc.) als andere, obwohl sie in der gleichen Schwangerschaftswoche geboren wurden. Auch über die Ursachen für diese unterschiedlich schwere Ausprägung von "frühgeborenentypischen" Problemen ist bislang nur sehr wenig bekannt. In letzter Zeit gibt es nun Hinweise darauf, dass bestimmte genetische Polymorphismen (das sind kleine Variationen der Erbsubstanz, die bei jedem Menschen vorkommen) den Verlauf von bestimmten Erkrankungen des Frühgeborenen, aber auch das Auftreten von Frühgeburtlichkeit beeinflussen können. Sollten sich unsere vorläufigen Untersuchungen bestätigen, so wäre dies von großer Bedeutung für die zukünftige Forschung, denn einige dieser Polymorphismen wurden gehäuft bei Frühgeborenen gefunden, die einen besonders unkomplizierten Verlauf hatten. Weiß man erst einmal weshalb einige Frühgeborene z.B. ohne Beatmung auskommen, so kann man versuchen diese genetische Eigenart durch Medikamente nachzuahmen, um so auch anderen Frühgeborenen zu helfen. Bislang ist jedoch noch nicht klar welche Polymorphismen für Frühgeborene Kinder besonders günstig oder ungünstig sind. Wir möchten Sie deshalb bitten einer anonymisierten Untersuchung bestimmter Polymorphismen bei Ihnen und Ihrem Kind zuzustimmen. Für die Untersuchung benötigen wir lediglich jeweils zwei Mundschleimhautabstriche von Mutter und Kind. Die Abstriche werden mit einem sterilen Wattetupfer gemacht und bedeuten auch für sehr kleine Kinder keine Belastung. Es werden nur Polymorphismen untersucht, die im Sinne der oben genannten Fragestellung relevant sein könnten. Aus dem verwendeten Material werden keine anderen Untersuchungen durchgeführt und die Datenschutzbestimmungen werden eingehalten. Da wir alle Untersuchungen aus Datenschutzgründen vollständig anonymisiert durchführen (d.h. alle Namen werden in unserem Labor durch Nummern ersetzt und die personenbezogenen Daten wie Name und Geburtstag werden vor Beginn der Untersuchung vollständig gelöscht), können wir Ihnen leider keine Untersuchungsergebnisse mitteilen. Wir hoffen durch diese Studie kleinen Frühgeborenen in Zukunft noch besser helfen zu können. Falls Sie zu der Studie noch Fragen haben wenden Sie sich bitte an den ihr Kind behandelnden Arzt, bzw. an einen der unterzeichnenden Ärzte der lokalen Studienleitung.

Prof. J. Möller, Dr W. Göpel

Abbildung 8.2: Aufklärungsbogen

Datenbogen

Datenbogen für die Studie „Genetische Risikofaktoren bei Frühgeborenen“

Kind

Name des Kindes _____
Tag der Geburt ____/____/____
Geschlecht männlich weiblich
Mehrling nein ja wenn ja, Anzahl Mehrlinge: ____ lfd. Nr.: ____
Geburtsgewicht _____ g Länge _____ cm Kopfumfang _____ cm
APGAR ____/____/____
Nabelarterien-ph (falls gemessen) _____
Antenatale Lungenreifebehandlung nein ja

Entbindung

Gestationsalter: ____ vollendete Schwangerschaftswochen + ____ Tage
Geburtslage Schädellage Beckenendlage
andere _____
Entbindungsmodus spontan / Manualhilfe Forceps / Vakuum
Sectio _____
Ursache der zu frühen Geburt (nur bei Frühgeborenen):
 unhemmbare Wehen pathologisches CTG
 V. a. Amnioninfektionssyndrom Plazentalösung
 EPH-Gestose sonstiges _____

Mutter

Geburtsjahr _____
Herkunftsland der Mutter Deutschland
 Übriges Europa einschl. Rußland
 Naher Osten einschl. Türkei und Nordafrika
 Asien Afrika Sonstige: _____
Anzahl vorausgegangener Schwangerschaften _____
Anzahl vorausgegangener Geburten _____
Falls vorausgegangene Geburten:
Darunter Frühgeborene (<37+0 SSW) nein ja wenn ja: Anzahl: _____
Darunter Frühgeborene (<32+0 SSW) nein ja wenn ja: Anzahl: _____
Zigarettenkonsum (nach Bekanntwerden der Ss) nein ja wenn ja: Anzahl/Tag: _____

Abbildung 8.3: Datenbogen für Genetische Risikofaktoren bei Frühgeborenen

Neonatalerhebungsbogen

Patient	
1. Patienten-Nummer: 1111111	
2. Einling/Anzahl Mehrlinge: 0 lfd. Nr. Mehrling:0	
3. geboren am: 01.01.2001	
4. Geschlecht: männl. Geb.-Gewicht: 0 g	
5. errechneter Geburtstermin: . . .	
6. Reifealter: 0 SSW	
7. Postleitzahl des Wohnortes:	
Aufnahme	
8. Aufnahme datum: . . . Uhrzeit:	
9. von:	
10. Körpertemperatur: 0,0 °C Gewicht: 0 g	
11. Länge: 0 cm Kopfumfang: 0,0 cm	
12. Bilirubin (aufnahmeentscheidender Wert): mg/dl oder µmol/l	
13. CRIB- Score Fehlbildungen: i.d. ersten 12 Lebensstunden gemessenes größtes Basendefizit: mmol/l minimaler FiO ₂ über 15 min.: maximaler FiO ₂ über 15 min.:	
Diagnostik/Therapie	
14. Sauerstoffzufuhr jeglicher Art nach Aufnahme: wenn ja, Beginn: . . . endgültige Beendigung: . . .	
15. maschinelle Beatmung? (nicht CPAP): wenn ja, Beginn: . . . endgültige Beendigung: . . . endg. Beendigung jegl. Atemhilfe: . . . Pneumothorax während der Beatmung:	
16. Sepsis: wenn ja, Beginn: . . . Erreger lt. Kat. in Blut, Liquor oder Urin: typische klinische Symptomatik: höchstes gemessenes CrP: mg/dl höchster ermittelter I/T-Quotient: wenn 2. Sepsis: Erreger lt. Kat: wenn 3. Sepsis: Erreger lt. Kat:	
17. Antibiotika, systemisch:	
18. perinatale Hypoxie/Ischämie (Asphyxie): HIE: wenn ja und Tragzeit > 36 SSW: Krampfanfälle: jeweils schlechtester Befund vom 2.-4. Lebenstag für: Bewußtseinslage: Muskeltonus: Saugreflex: Mororeaktion: erstes EEG: . . . wenn durchgeführt, Befund:	
19. Schädelsonogramm wenn durchgeführt: IVH: wenn ja, max. Stadium: 0 PVL:	
20. Ophthalmologische Untersuchung: wenn durchgeführt: Datum der Erstuntersuchung: . . . Retinopathie: wenn ja, max. Stadium: 0	
21. apparatives Hörscreening: auffällig:	
22. Operation(en) während des stat. Aufenthaltes: wenn ja, wegen Diagnose(n) lt. Katalog	
Entlassung/Verlegung	
23. Zwischenzeitlich verlegt: . . . in Kinderklinik: Wiederaufnahme: . . .	
24. Aufenthalt beendet: . . . Grund: Gewicht: 0 g Länge: 0 cm Kopfumfang: 0,0 cm wenn verlegt: in Klinik: wenn verstorben: Uhrzeit: Todesursache (Diagnose lt. Kat.): Autopsie:	
25. weitere Diagnosen (lt. Katalog):	

Abbildung 8.4: Neonatalerhebungsbogen

Teilnehmende Kliniken

Klinik für Kinder und Jugendmedizin
Am Hasenkopf 1
63739 Aschaffenburg

Universitätskinderklinik Bochum
St. Josefs-Hospital
Alexandrinenstraße 5
44791 Bochum

Klinik für Allgemeine Pädiatrie
Moorenstr. 5
40225 Düsseldorf

Kinderklinik Eutin
Ostholstein Kliniken
Janusstrasse 22
23701 Eutin

Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin
Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Soldmannstrasse 15
17487 Greifswald

Altonaer Kinderkrankenhaus
Bleickenallee 38
22763 Hamburg

Kinderkrankenhaus auf der Bult
Janusz-Korczak-Allee 12
30173 Hannover

Kinderklinik Kassel
Monchenbergstrasse 41-43
34125 Kassel

Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Klinik für Allgemeine Pädiatrie
Schwanenweg 20
24105 Kiel

Klinik und Poliklinik für Allgemeine Kinderheilkunde
Joseph-Stelzmann Str. 9
50924 Köln

Universitätsklinik für Kinder und Jugendliche
Liebingstraße 20a
04103 Leipzig

Klinik für Kinder und Jugendmedizin
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Kinderklinik St. Hedwig
Steinmetzstrasse 1-3
93049 Regensburg

Klinik für Kinder und Jugendmedizin
Winterberg 1
66119 Saarbrücken

Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Olgahospital
Bismarckstraße 8
70176 Stuttgart

Literaturverzeichnis

- [1] W. Meadow, G. Lee, K. Lin, and J. Lantos, "Changes in mortality for extremely low birth weight infants in the 1990s: Implications for treatment decisions and resource use.," *Pediatrics*, vol. 113, p. 1223, 2004.
- [2] E. Gaillard, R. Cooke, and N. Shaw, "Improved survival and neurodevelopmental outcome after prolonged ventilation in preterm neonates who have received antenatal steroids and surfactant.," *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, vol. 84, p. F194, 2001.
- [3] J. Martin, B. Hamilton, P. Sutton, *et al.*, "Birth: final data for 2005.," *Natl Vital Stat Rep*, vol. 56, p. 1, 2007.
- [4] J. Martin, H. Kung, T. Mathews, *et al.*, "Annual summary of vital statistics:2006," *Pediatrics*, vol. 121, p. 788, 2008.
- [5] T. Markestad, P. Kaaresen, A. Ronnestad, *et al.*, "Early death, morbidity, and needs of treatment among extremely premature infants," *Pediatrics*, vol. 115, p. 1289, 2005.
- [6] . © Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, "F202-natürliche Bevölkerungsbewegungen," tech. rep., Statistisches Bundesamt F202-Natürliche Bevölkerungsbewegungen 65180 Wiesbaden, 2010.
- [7] Bloom, Yost, McIntire, and Leveno, "Recurrence of preterm birth in singleton and twin pregnancies," *Obstet Gynecol*, vol. 98, p. 379, 2001.
- [8] Esplin, O'Brien, Fraser, *et al.*, "Estimating recurrence of spontaneous preterm delivery," *Obstet Gynecol*, vol. 112, p. 516, 2008.
- [9] A. P. B. 56, "Multiple gestation: complicated twin, triplet, and high-order multifetal pregnancy," *Obstet Gynecol*, vol. 104, p. 869, 2004.

- [10] Kiely, "What is the population-based risk of preterm birth among twins and other multiples?," *Clin Obstet Gynecol*, vol. 41, p. 3, 1998.
- [11] K. Bühler *et al.*, "Deutsches ivf register jahrbuch 2010," *J Repr. Endocrin*, vol. 8(4), pp. 253–80, 2011.
- [12] D. Smith and R. Kirsop, "Cervical incompetence occurring after caesarean section:a case report," *Asian Oceania J Obstet Gynaecol*, vol. 17, p. 225, 1991.
- [13] W. Grundberger and P. Riss, "Cervical incompetence after previous cervical dilatation and curettage," *Wien Med Wochenschr*, vol. 129, p. 390, 1979.
- [14] J. Kristensen, J. Langhoff-Roos, and F. Kristensen, "Increased risk of preterm birth in women with cervical conization," *Obstet Gynecol*, vol. 81, p. 1005, 1993.
- [15] M. van Rooijen and E. Persson, "Pregnancy outcome after laser vaporization of the cervix," *Acta Obstet Gynecol Scand*, vol. 78, p. 346, 1999.
- [16] N. Vyas, J. Vink, A. Ghidini, *et al.*, "Risk factors of cervical insufficiency after term delivery.," *Am J Obstet Gynecol*, vol. 195, p. 787, 2006.
- [17] R. Goldenberg, J. Iams, M. Miodovnik, *et al.*, "The preterm prediction study: risk factors in twin gestations. national institute of child health and human development maternal- fetal medicine units network," *Am Obstet Gynecol*, vol. 175, p. 1047, 1996.
- [18] M. Sakai, A. Shiazaki, M. Tabata, *et al.*, "Evaluation of effectiveness of prophylactic cerclage of a short cervix according to interleukin-8 in cervical mucus.," *Am J Obstet Gynecol*, vol. 194, p. 14, 2006.
- [19] C. Ou, A. Orsino, and S. Lye, "Expression of connexin-43 and connexin-26 in the rat myometrium during pregnancy and labor is differentially regulated by mechanical and hormonal signals," *Endocrinology*, vol. 138, p. 5398, 1997.

- [20] R. Word, J. Stull, M. Casey, and K. Kamm, "Contractile elements and myosin light chain phosphorylation in myometrial tissue from nonpregnant and pregnant women," *J Clin Invest*, vol. 92, p. 29, 1993.
- [21] J. Iams, R. Goldenberg, P. Meis, *et al.*, "Relative risk of preterm delivery as a function of cervical length," *N Engl J Med*, vol. 334, p. 567, 1996.
- [22] P. Heinonen, "Unicornuate uterus and rudimentary horn," *Fertil Steril*, vol. 68, p. 224, 1997.
- [23] M. Cooney, C. Benson, and P. Doubilet, "Outcome of pregnancies in women with uterine duplication anomalies," *J Clin Ultrasound*, vol. 26, p. 3, 1998.
- [24] Norwitz, Robinson, and Challis, "The control of labor," *N Engl J Med*, vol. 341, p. 660, 1999.
- [25] W. Blanc, "Pathology of the placenta, membranes, and umbilical cord in bacterial, fungal, and viral infections in man," *Monogr Pathol*, p. 67, 1981.
- [26] R. Naeye, "Acute bacterial chorioamnionitis," *Prog Clin Biol res*, vol. 281, p. 73, 1988.
- [27] C. Salafia, C. Vogel, A. Vintzileos, *et al.*, "Placental pathologic findings in preterm birth," *Am J Obstet Gynecol*, vol. 165, p. 934, 1991.
- [28] L. Klein and R. Gibbs, "Use of microbial cultures and antibiotics in the prevention of infection-associated preterm birth," *Am J Obstet Gynecol*, vol. 190, p. 1493, 2004.
- [29] M. Willialms, W. O'Brien, R. Nelson, and W. Spellacy, "Histologic chorioamnionitis is associated with fetal growth restriction in term and preterm infants," *Am J Obstet Gynecol*, vol. 183, p. 1094, 2000.
- [30] Williams, Mittendorf, Lieberman, and Monson, "Adverse infant outcomes associated with first-trimester vaginal bleeding," *Obstet Gynecol*, vol. 78, p. 14, 1991.

- [31] Harger, Hasing, Toumala, *et al.*, “Risk factors for preterm premature rupture of fetal membranes: a multicenter case-control study,” *Am J Obstet Gynecol*, vol. 163, p. 130, 1990.
- [32] Ekwo, Gosselink, and Moawad, “Unfavorable outcome in penultimate pregnancy and premature rupture of membranes in successive pregnancy,” *Obstet gynecol*, vol. 80, p. 166, 1992.
- [33] S. Dolan, S. Gross, I. Merkatz, *et al.*, “The contribution of birth defects to preterm birth and low birth weight,” *Obstet Gynecol*, vol. 110, p. 318, 2007.
- [34] S. Purisch, E. DeFranco, L. Muglia, *et al.*, “Preterm birth in pregnancies complicated by major congenital malformations: a population-based study,” *Am J Obstet Gynecol*, vol. 199, p. 287, 2008.
- [35] N. Morken, K. Kallen, and B. Jacobsson, “Fetal growth and onset of delivery: a nationwide population-based study of preterm infants,” *Am Obstet Gynecol*, vol. 195, p. 154, 2006.
- [36] J. Zeitlin, M. Ancaurel-Cubizolles, and E. Papiernik, “The relationship between intrauterine growth restriction and preterm delivery: an empirical approach using data from european case-control study,” *BJOG*, vol. 107, p. 750, 2000.
- [37] J. Gardosi, “Prematurity and fetal growth restriction,” *Early Hum Dev*, vol. 81, p. 43, 2005.
- [38] A. d. W. M. F. Bundesärztekammer, Kassenärztliche Bundesvereinigung, “Asthma kurzfassung version 1.3,” tech. rep., AWMF Programm für Nationale Versorgungsleitlinien, 2011.
- [39] C. Ober, T. Zheng, *et al.*, “Effect of variation in chi311 on serum ykl-40 level, risk of asthma, and lung funktion,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 358, pp. 1682–91, 2008.
- [40] S. Letuve, A. Kozhich, N. Arouche, M. Grandsaigne, J. Reed, M. Dombret, P. Kiener, M. Aubier, A. Coyle, and M. Pretolani, “Ykl-40 is eleva-

- ted in patients with chronic obstructive pulmonary disease and activates alveolar macrophages.," *J Immunol*, vol. 181, pp. 5167–5173, 2008.
- [41] R. A. N. D. P. P. Johansen JS, Vittrup Jensen B, "Serum ykl-40, a new prognostic biomarker in cancer patients?," *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, vol. 15(2), pp. 194–202, 2006.
- [42] J. Johansen, J. Hvolris, M. Hansen, V. Backer, I. Lorenzen, and P. Price, "Serum ykl-40 levels in healthy children and adults. comparison with serum and synovial fluid levels of ykl-40 in patients with osteoarthritis or trauma of the knee joint.," *Rheumatology*, vol. 35, pp. 553–559, 1996.
- [43] M. Rojas, A. Gonzalez, E. Bancalari, *et al.*, "Changing trends in the epidemiology and pathogenesis of neonatal chronic lung disease.," *J Pediatr*, vol. 126, pp. 605–610, 1995.
- [44] C. Speer, "Inflammation and bronchopulmonary dysplasia: a continuing story.," *Semin Fetal Neonatal Med*, vol. 11, pp. 354–362, 2006.
- [45] E. Walter, W. Ehlenbach, D. Hotchkin, *et al.*, "Low birth weight and respiratory disease in adulthood: a population-based case-control study.," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 180, p. 176, 2009.
- [46] R. M. M. Obladen, *Neugeborenen Intensivmedizin*. Springer.
- [47] V. Bhandari, M. Bizzarro, A. Shetty, *et al.*, "Familial and genetic susceptibility to major neonatal morbidities in preterm twins.," *Pediatrics*, vol. 117, p. 1901, 2006.
- [48] S. Abman, P. Mourani, and M. Sontag, "Bronchopulmonary dysplasia: a genetic disease," *Pediatrics*, vol. 122, p. 658, 2008.
- [49] A. Jobe, "The new bpd: an arrest of lung development.," *Pediatr Res*, vol. 46, p. 641, 1999.
- [50] G. Georeson, B. Szony, K. Streitman, and I. Varga, "Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via caesarean section.," *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, vol. 103, p. 136, 2002.

- [51] M. Walsh, Q. Yao, P. Gettner, *et al.*, “Impact of a physiologic definition on bronchopulmonary dysplasia rats.,” *Pediatrics*, vol. 114, pp. 1305–1311, 2004.
- [52] D. Roberts and S. Dalziel, “Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth,” *Cochrane Database Syst Rev*, vol. CD004454, 2006.
- [53] T. O’Shea, L. Washburn, P. Nixon, and D. Goldstein, “Follow-up of a randomized, placebo-controlled trial of dexamethasone to decrease the duration of ventilator dependency in very low birth weight infants: neurodevelopmental outcome at 4 to 11 years of age,” *Pediatrics*, vol. 120, p. 594, 2007.
- [54] K. Watterberg, M. Shaffer, M. Mishefske, *et al.*, “Growth and neurodevelopmental outcomes after early low-dose hydrocortisone treatment in extremely low birth weight infants.,” *Pediatrics*, vol. 120, p. 40, 2007.
- [55] H. Halliday, R. Ehrenkranz, and L. Doyle, “Early postnatal (<96 hours) corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants.,” *Cochrane Database Syst Rev*, vol. CD001146, 2003.
- [56] D. L. Halliday HL, Ehrenkranz RA, “Moderately early (7-14 days) postnatal corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants.,” *Cochrane Database Syst Rev*, vol. CD001144, 2003.
- [57] S. Gross *et al.*, “effect of preterm birth on pulmonary function at school age: a prospective controlled study,” *J Pediatr*, vol. 133, p. 188, 1998.
- [58] L. Doyle *et al.*, “Bronchopulmonary dysplasia and very low birthweight: lung function at 11 years of age.,” *J Paediatr*, vol. 32, p. 339, 1996.
- [59] S. Jacob *et al.*, “Long-term pulmonary sequelae of severe bronchopulmonary dysplasia.,” *J Pediatr*, vol. 133, p. 193, 1998.
- [60] A. Koumbourlis *et al.*, “Longitudinal follow-up of lung function from childhood to adolescence in prematurely born patients with neonatal chronic lung disease,” *Pediatr Pulmonol*, vol. 21, p. 28, 1996.

- [61] S. Mitchell and W. Teague, "Reduced gas transfer at rest and during exercise in school-age survivors of bronchopulmonary dysplasia," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 157, p. 1406, 1998.
- [62] J. Allen *et al.*, "Statement on the care of child with chronic lung disease of infancy and childhood.," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 168, p. 356, 2003.
- [63] L. Doyle, B. Faber, C. Callanan, *et al.*, "Bronchopulmonary dysplasia in very low birth weight subjects and lung function in late adolescence.," *Pediatrics*, vol. 118, p. 108, 2006.
- [64] B. Robin *et al.*, "Pulmonary function in bronchopulmonary dysplasia.," *Pediatr Pulmonol*, vol. 37, p. 236, 2004.
- [65] J. Allen and H. Panitch, "Lung function testing: chronic lung disease of infancy," *Pediatr Pulmonol*, vol. 23, p. 138, 2001.
- [66] E. Baraldi and M. Filippone, "Chronic lung disease after preterm birth.," *N Engl J Med*, vol. 357, p. 1946, 2007.
- [67] C. Korff and D. J. Nordli, "Do generalized tonic-clonic seizures in infancy exist?," *Neurology*, vol. 65, p. 1750, 2005.
- [68] P. Uldall, J. Alving, L. Hansen, *et al.*, "The misdiagnosis of epilepsy in children admitted to a tertiary epilepsy centre with paroxysmal events.," *Arch Dis Child*, vol. 91, p. 219, 2006.
- [69] L. Hamiwaka, N. Singh, J. Niosi, and E. Wirrell, "Diagnostic inaccuracy in children referred with "first seizure": role for a first seizure clinic.," *Epilepsia*, vol. 48, p. 1062, 2007.
- [70] D. G. für Neurologie, *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. Georg Thieme verlag, 2008.
- [71] K. Berger, J. Luedemann, C. Trenkwalder, *et al.*, "Sex and the risk of restless legs syndrome in the general population," *Arch Intern Med*, vol. 164, p. 196, 2004.

- [72] D. Picchiatti, R. Allen, A. Walters, *et al.*, “Restless legs syndrom: prevalence and impact in children and adolescents-the peds rest study.,” *Pediatrics*, vol. 120, p. 253, 2007.
- [73] I. Pichler, F. Marroni, C. Volpato, *et al.*, “Linkage analysis identifies a novel locus for restless legs syndrome on chromosome 2q in a soth tyrolean population isolate.,” *Am J Hum Genet*, vol. 79, p. 716, 2006.
- [74] H. Stefansson, D. Rye, A. Hicks, *et al.*, “A genetic risk factor for periodic limb movements in sleep,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 357, pp. 639–47, 2007.
- [75] J. Winkelmann, B. Schormair, P. Lichtner, *et al.*, “Geneome-wide association study of restless legs syndrome identifies common variants in three genomic regions.,” *Nat. Genet*, vol. 39, p. 1000, 2007.
- [76] S. Chen, W. Ondo, S. Rao, *et al.*, “Genomewide linkage scan identifies a novel susceptibility locus for restless legs syndrome on chromosome 9p.,” *Am J Hum Genet*, vol. 74, p. 876, 2004.
- [77] K. Lohmann-Hedrich, A. Neumann, A. Kleensang, *et al.*, “Evidence for linkage of restless leg syndrome to chromosome 9p: are there two distinct loci?,” *Neurology*, vol. 70, p. 686, 2008.
- [78] A. Desautels, G. Turecki, J. Montplaisir, *et al.*, “Identifikation of a major susceptibility locus for restless legs syndrome on chromosome 12q.,” *Am J Hum Genet*, vol. 69, p. 1266, 2001.
- [79] A. Desautels, G. Turecki, J. Montplaisir, *et al.*, “Restless legs syndrome: confirmation of linkage to chromosome 12q, genetic heterogeneity, and evidence of complexity,” *Arch Neurol*, vol. 62, p. 591, 2005.
- [80] M. Bonati, L. Ferini-Stramb, P. Aridon, *et al.*, “Autosomal dominant restless legssyndrome maps on chromosome 14q.,” *Brain*, vol. 126, p. 1485, 2003.
- [81] A. Levchenko, S. Provost, J. Montplaisir, *et al.*, “A noval autosomal dominant restless legs syndrome locus maps to chromosome 20p13.,” *Neurology*, vol. 67, p. 900, 2006.

- [82] N. Bouatia-Naji, G. Rocheleau, and L. Van Lommel, “A polymorphism with the *g6pc2* gene is associated with fasting plasma glucose levels,” *Science*, vol. 320, pp. 1085–88, 2008.
- [83] M. Sze May Ng and E. AJB, “Continuous insulin infusion in hyperglycaemic extremely-low-birth-weight neonates,” *Biol Neonate*, vol. 87, pp. 269–72, 2005.
- [84] L. Kao, B. Morris, K. Lally, *et al.*, “Hyperglycemia and morbidity and mortality in extremely low birth weight infants,” *J Perinatol*, vol. 26, p. 730, 2006.
- [85] C. Blanco, J. Baillargeon, R. Morrison, and G. AK, “Hyperglycemia in extremely low birth weight infants in a predominantly hispanic population and related morbidities,” *J Perinatol*, vol. 26, p. 737, 2006.
- [86] W. Meetze, R. Bowsher, and J. Compton, “Hyperglycemia in extremely-low-birth-weight infants,” *Biol Neonate*, vol. 74, pp. 214–21, 1998.
- [87] K. Beardsall, S. Vanhaesbrouck, A. Ogilvy-Stuart, *et al.*, “Early insulin therapy in very-low-birth-weight infants,” *N Engl J Med*, vol. 359, p. 1873, 2008.
- [88] N. Saman, J. Erdmann, and A. Hall, “Genomwide association analysis of coronary artery disease,” *New England Journal of Medicine*, vol. 357, pp. 443–53, 2007.
- [89] J. Hill, T. Tremblay, C. Cantin, M. O’Connor-McCourt, J. Kelly, and E. Lenferink, “Glycoproteomic analysis of two mouse mammary cell lines during transforming growth factor (tgf)-beta induced epithelial to mesenchymal transition,” *Proteome Science*, vol. 7, p. 2, 2009.
- [90] R. Huxley, A. Neil, and R. Collins, “Unravelling the fetal origins hypothesis: is there really an inverse association between birthweight and subsequent blood pressure?,” *Lancet*, vol. 360, p. 659, 2002.
- [91] W. Hoy, M. Hughson, J. Bertram, *et al.*, “Nephron number, hypertension, renal disease, and renal failure,” *J Am Soc Nephrol*, vol. 16, p. 2557, 2005.

- [92] T. Samuel, W. Hoy, R. Douglas-Denton, *et al.*, “Determinants of glomerular volume in different clinical zones of human kidney.,” *J Am Soc Nephrol*, vol. 16, p. 3102, 2005.
- [93] M. Keijzer-Veen, H. Kleinveld, M. Lequin, *et al.*, “Renal function and size at young adult age after intrauterine growth restriction and very preterm birth.,” *Am J Kidney Dis*, vol. 50, p. 542, 2007.
- [94] M. Hughson, “Low birth weight and kidney function: is there a relationship and is it determined by the intrauterine environment?,” *Am J Kidney Dis*, vol. 50, p. 531, 2007.
- [95] M. Rodriguez, A. Gomez, C. Abitbol, *et al.*, “Histomorphometric analysis of postnatal glomerulogenesis in extremely preterm infants.,” *Pediatr Dev Pathol*, vol. 7, p. 17, 2004.
- [96] H. Hitter, N. Hirsch, and A. Rudolph, “Assessment of gestational age by examination of the anterior vascular capsule of the lens,” *J Pediatr*, vol. 91, p. 455, 1977.
- [97] A. Vannay, G. Duna, I. Banyasz, *et al.*, “Association of genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor and risk for proliferative retinopathy of prematurity,” *Pediatr Res*, vol. 57, p. 369, 2005.
- [98] W. Good, R. Hardy, V. Dobson, *et al.*, “The incidence and course of retinopathy of prematurity: findings from the early treatment for retinopathy of prematurity study.,” *Pediatrics*, vol. 116, p. 15, 2005.
- [99] A. Fanaroff, B. Stoll, L. Wright, *et al.*, “Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birth weight infants,” *Am J Obstet Gynecol*, vol. 196, p. 147, 2007.
- [100] I. Seri and S. Noori, “Diagnosis and treatment of neonatal hypotension outside the transitional period.,” *Early Hum Dev*, vol. 81, p. 405, 2005.
- [101] D. Osborn, N. Evans, M. Kluckow, *et al.*, “Low superior vena cava flow and effect of ionotropes on neurodevelopment to 3 years in preterm infants,” *Pediatrics*, vol. 120, p. 372, 2007.

- [102] S. M. W. G. The International, "A map of human genome sequence variation containing 1,42 million single nucleotid polymorphisms," *Nature*, vol. 409, pp. 928–34, 2001.
- [103] A. Brookes, "The essence of snps.," *Gene*, vol. 234, pp. 177–186, 1999.
- [104] L. Kruglyak and D. Nickerson, "Variation is the spice of life.," *Nat. Gent*, vol. 27, pp. 234–236, 2001.
- [105] D. Hinds, L. Stuve, G. Nilsen, E. Halperin, D. Ballinger, K. Frazer, and D. Cox, "Whole-genome patterns of common dna variation in three human populations.," *Science*, vol. 307, pp. 1072–1079, 2005.
- [106] Qiagen, "Qiamp dna mini and blood mini handbook," tech. rep., 2007.
- [107] A. Biosystems, "Taqman snp genotyping assay protocol," tech. rep., 2003.
- [108] J. Teitler, N. Reichman, L. Nepomnyaschy, and M. Martinson, "A cross-national comparsion of racial and ethnic disparities in low birth weight in the united states and england," *Pediatrics*, vol. 120, p. e1182, 2007.
- [109] H. Gohlke, T. Illig, M. Bahnweg, N. Klopp, E. Adre, *et al.*, "Association of the interleukin-1-receptor antagonist gene with asthma.," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 169, pp. 1217–1223, 2004.
- [110] D. Smyth, J. Cooper, *et al.*, "A genome-wide association study of nonsynonymous snps identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (ifih1) region.," *Nat Genet*, vol. 38, pp. 617–619, 2006.
- [111] D. Miller, R. Zee, D. Suk, *et al.*, "Association of common crp gene variants with crp levels and cardiovascular events.," *Ann Hum Genet*, vol. 69, pp. 623–638, 2005.
- [112] P. Ng and S. Henikoff, "Accounting for human polymorphisms predicted to affect protein function.," *Genome Res*, vol. 12, pp. 436–446, 2002.
- [113] F. Cipollone, E. Toniato, *et al.*, "A polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene as an inherited protective factor against myocardial infarction and stroke.," *JAMA*, vol. 291, pp. 2221–2228, 2004.

- [114] L. Cardon and J. Bell, "Association study designs for complex diseases.," *Nature Rev Genet*, vol. 2, pp. 91–99, 2001.
- [115] "Weiss st, speizer fe. epidemiology and natural history. in: Bronchial asthma mechanisms and therapeutics, 3d ed, weiss eb, stein m (eds), little, brown, boston 1993. p.15.."
- [116] J. Cunningham, K. Basu, R. Tavendale, C. Palmer, H. Smith, and S. Mukhopadhyay, "The chi311 rs 4950928 polymorphism is associated with asthma-related hospital admissions in children and young adults.," *Ann Allergy Asthma Immunol.*, vol. 106(5), pp. 381–6, 2011.
- [117] A. Hadchouel, X. Durrmeyer, E. Bouzigon, R. Incitti, J. Huusko, P. Jarreau, R. Lenclen, F. Demenais, M. Franco-Montoya, I. Layouni, J. Patkai, J. Bourbon, M. Hallman, C. Danan, and C. Delacourt, "Identification of spock2 as a susceptibility gene for bronchopulmonary dysplasia.," *Am J Respir Crit Care Med.*, vol. 184, pp. 1164–1170, 2011.
- [118] M. Krueger, A. Heinzmann, B. Mailaparambil, C. Härtel, and W. Göpel, "Polymorphisms of il 18 in the genetics of preterm birth and bronchopulmonary dysplasia.," *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.*, vol. 96(4), pp. 200–300, 2011.
- [119] B. Mailaparambil, M. Krueger, U. Heizmann, K. Schlegel, J. Heinze, and A. Heinzmann, "Genetic and epidemiological risk factors in the development of bronchopulmonary dysplasia.," *Dis Markers*, vol. 29(1), p. 1.9, 2011.
- [120] V. Sampath, J. Garland, M. Le, A. Patel, G. Konduri, J. Cohen, P. Simpson, and R. Hines, "A tlr5 (g.1174c>t) variant that encodes a stop codon (r392x) is associated with boronchopulmonary dysplasia.," *Pediatr Pulmonol*, 2011.
- [121] A. Malone, C. Ryan, A. Fitzgerald, L. Burgoyne, S. Conolly, and G. Boylan, "Interobserver agreement in neonatal seizure identification.," *Epilepsia*, vol. 50, pp. 2097–2101, 2009.

- [122] J. Rivière, L. Xiong, A. Levchenko, J. St-Onge, C. Gaspar, Y. Dion, P. Lespérance, G. Tellier, F. Richer, S. Chouinard, and G. Rouleau, “Association of intronic variants of the *btbd9* gene with tourette syndrome.” *Arch Neurol.*, vol. 66(10), p. 1267.72, 2009.
- [123] B. Schormair, J. Plag, M. Kaffe, N. Gross, D. Czamara, W. Samtleben, P. Lichtner, A. Ströhle, I. Stefanidis, A. Vainas, E. Dardiotis, G. Sakkas, C. Gieger, B. Müller-Myhsok, T. Meitinger, U. Heemann, G. Hadjigeorgiou, K. Oexle, and J. Winkelmann, “*Meis1* and *btbd9*: genetic association with restless legs syndrome in end stage renal disease.” *J Med Genet.*, vol. 48(7), pp. 462–6, 2011.
- [124] H. Goldberg-Stern, R. Kaufmann, S. Kivity, Z. Afawi, and S. Heron, “Novel mutation in *kcq2* causing benign familial neonatal seizures.” *Pediatr Neurol.*, vol. 41(5), pp. 367–70, 2009.
- [125] D. Mitanchez-Mokhtari, N. Lahlou, F. Kieffer, *et al.*, “Both relative insulin resistance and defective islet beta-cell processing of proinsulin are responsible for transient hyperglycemia in extremely preterm infants.” *Pediatrics*, vol. 113, p. 537, 2004.
- [126] Y. Ioannou, S. Ellard, A. Hattersley, and N. Skordis, “*Kcnj11* activating mutations cause both transient and permanent neonatal diabetes mellitus in Cypriot patients.” *Pediatr Diabetes*, vol. 12(2), pp. 133–7, 2011.
- [127] K. Pilgaard, K. Færch, B. Carstensen, P. Poulsen, C. Pisinger, O. Pedersen, D. Witte, T. Hansen, T. Jørgensen, and A. Vaag, “Low birthweight and premature birth are both associated with type 2 diabetes in a random sample of middle-aged Danes.” *Diabetologia*, vol. 53(12), pp. 2526–30, 2010.
- [128] H. Chen, X. Gu, Y. Liu, J. Wang, S. Wirt, R. Bottino, H. Schorle, J. Sage, and S. Kim, “*Pdgf* signaling controls age-dependent proliferation in pancreatic β -cells.” *Nature*, vol. 478, pp. 349–355, 2011.
- [129] J. Lee, Y. Lee, J. Mamrosh, S. Busby, P. Griffin, M. Pathak, E. Ortlund, and D. Moore, “A nuclear-receptor-dependent phosphatidylcholine pathway with antidiabetic effects.” *Nature*, vol. 474, pp. 506–510, 2011.

- [130] K. Ryckman, J. Dagle, K. Kelsey, A. Momany, and J. Murray, “Replication of genetic association in the inflammation, complement, and coagulation pathways with intraventricular hemorrhage in lbw preterm neonates,” *Pediatr Res.*, vol. 70(1), pp. 90–5, 2011.