

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

**Atemnotsyndrom bei sehr unreifen Frühgeborenen:  
Eine genomweite Assoziationsstudie**

Inauguraldissertation

zur

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

vorgelegt von  
Friederike Pagel  
aus Hamburg

Lübeck 2019

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. W. Göpel
2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. C. Stamme

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2020

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 30.04.2020

Promotionskommission der Sektion Medizin



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Frühgeburtlichkeit	1
1.2	Das Atemnotsyndrom Frühgeborener	2
1.2.1	Klinik und Pathophysiologie	2
1.2.2	Therapie	3
1.2.3	Multifaktorieller Kontext	5
1.2.4	Hereditäre Einflussfaktoren	6
1.3	Genetik	11
1.3.1	Polygene Merkmalsvererbung	11
1.3.2	Das menschliche Genom und seine Variationen: Einzelnukleotid-Polymorphismen	12
1.3.3	Genomweite Assoziationsstudien	13
1.4	Fragestellung der Arbeit	14
<b>2</b>	<b>Patienten, Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1	Studienpopulation	15
2.2	Erhebung Klinischer Daten	15
2.3	Isolierung und Aufbereitung genomischer DNA	16
2.4	DNA-Sequenzierung und SNP-Genotypisierung	17
2.4.1	Chip-Genotypisierung	17
2.4.2	SNP-Genotypisierung	17
2.5	Statistische Analysen	21
2.5.1	Berechnung der GWAS	21
2.5.2	Allgemeine statistische Analysen	24
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>25</b>
3.1	Demographische und Klinische Charakteristika der Studienteilnehmer	25
3.1.1	Surfactantapplikation	26
3.2	Ergebnis der Genomweiten Assoziationsstudie	27
3.3	Ergebnis der Replikation und Validierung der Variante rs4878404	31
3.4	Charakteristika der Variante rs4878404 und das LINGO2 Gen	34
3.4.1	Genetische Lokalisation und das LINGO2 Gen	34
3.4.2	Surfactantapplikation	35

## Inhaltsverzeichnis

3.4.3	Ethnie.....	37
3.4.4	Perinatale Umstände, Kardiorespiratorische Anpassung und Verlauf.....	37
3.4.5	Wichtigste Komorbiditäten, Mortalität und langfristige Entwicklung.....	39
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>41</b>
4.1	Genomweite Assoziationsstudie und Methodik.....	41
4.2	Der SNP rs4878404 und das LINGO2 Gen .....	43
4.3	Klinische Charakteristika der rs4878404 Allelträger.....	45
4.4	Schlussfolgerung und Perspektiven .....	45
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>63</b>
7.1	Genomische DNA Isolierung .....	63
7.1.1	Genomische DNA aus Nabelschnurproben.....	63
7.1.2	Genomische DNA aus Mundschleimhautabstrichen.....	63
7.2	Prä- und Perinatale klinische Charakteristika der rs4878404 Allelträger .....	65
7.3	LINGO2 .....	67
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>71</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Cluster Plot von SNP rs4878404 .....	19
Abbildung 2: Surfactantapplikation der VLBW Frühgeborenenkohorte .....	27
Abbildung 3: Manhattan Plot zur Surfactanttherapie VLBW Frühgeborener .....	28
Abbildung 4: Locus Zoom Plot von rs4878404 (Chromosom 9) für die Assoziation „Surfactanttherapie – JA/NEIN“ .....	34
Abbildung 5: Ergebnis der Replikation VLBW Frühgeborener (n=4874) der Variante rs4878404 zur Fragestellung „Surfactanttherapie JA/NEIN“ .....	35

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kandidatengene mit postulierter Suszeptibilität zum ANS.....	6
Tabelle 2: GWA „Top-Hit“ SNPs zur Genotypisierung mit fluoreszenzmarkierten Gensonden .....	20
Tabelle 3: Allelischer Diskriminierungs-Assay .....	20
Tabelle 4: PCR Zyklen.....	21
Tabelle 5: Protokoll weiterer Geräte .....	21
Tabelle 6: Charakteristika der VLBW Frühgeborenenkohorte.....	25
Tabelle 7: Ergebnisse der Genomweiten Assoziationsanalyse.....	29
Tabelle 8: Ergebnis der Replikation und GWAS von rs4878404 .....	32
Tabelle 9: Ergebnisse der Genomweiten Assoziationsanalyse und Replikation .....	33
Tabelle 10: Externe Surfactantapplikationsrate (absolut und prozentual) der VLBW Frühgeborenen (n=4874) der Variante rs4878404 abhängig vom Gestationsalter .....	36
Tabelle 11: Multivariate logistische Regression adjustiert zu Faktoren, die das Atemnotsyndrom beeinflussen und Variante rs4878404 (n=4874).....	36
Tabelle 12: Die Variante rs4878404 und Ethnie .....	37
Tabelle 13: Kardiorespiratorische Charakteristika rs4878404 für VLBW Frühgeborene .....	38
Tabelle 14: Komorbiditäten rs4878404 für VLBW Frühgeborene.....	39
Tabelle 15: Outcome rs4878404 VLBW Frühgeborene: Nachuntersuchung im Alter von 5-6 Jahren .....	40
Tabelle 16: Prä- und perinatale klinische Daten von VLBW Frühgeborenen stratifiziert nach rs4878404 Allelträgern.....	65
Tabelle 17: VLBW Frühgeborenen Daten stratifiziert nach rs10491678 Allelträgern .....	67
Tabelle 18: VLBW Frühgeborenen Daten stratifiziert nach rs10968574 Allelträgern .....	68
Tabelle 19: VLBW Frühgeborenen Daten stratifiziert nach rs10813121 Allelträgern .....	69
Tabelle 20: VLBW Frühgeborenen Daten stratifiziert nach rs683471 Allelträgern .....	70

## Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
ANS	Atemnotsyndrom
ABCA3	Teil der ATP-bindenden Kassettentransporter, essentiell für den Surfactantmetabolismus
APGAR	Score zur Beurteilung der neonatalen postnatalen Adaptation (Appearance, Pulse, Grimace, Activity, Respiration)
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
CD/MV	Common disease / multiple rare variant
CD/CV	Common disease / common variant
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CPAP	Continous Positive Airway Pressure
CRIB-Score	Clinical risc index for babies
dbSNP	Single Nucleotide Polymorphism Database
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ELBW	Extreme Low Birthweight (<1000g)
EPH Gestose	Gestationserkrankung mit Ödemen ( <i>Edema</i> ), <i>Proteinurie</i> und <i>Hypertension</i>
FEV1	Forciertes expiratorisches Volumen in einer Sekunde
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
FIP	Fokale intestinale Perforation
FOXF1	Forkhead Box F1
g	Gramm
GPRA	Mitglied der G-protein-coupled-superfamily (GPCR)
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GNN	German Neonatal Network
GWA	Genomweite Assoziationsanalyse
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HELLP	Gestationserkrankung: <i>Haemolysis</i> , <i>Elevated Liver enzyme levels</i> , <i>Low Platelet counts</i>
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
IFN- $\gamma$	Interferon Gamma
IL10	Interleukin 10
IQ	Intelligenzquotient
IUGR	Intrauterine growth restriction
IVH	Intraventrikuläre Hämorrhagie
kb	Kilobasenpaar

## Abkürzungsverzeichnis

KI	Konfidenzintervall
LD	Linkage disequilibrium
LISA	Less Invasive Surfactant Application (Methode zur Surfactantapplikation)
LBW	Low Birth Weight Infant (<2500g)
mABC	Movement Assessment Battery for Children
MAF	Minor Allel Frequenz
MDS	Multidimensionale Skalierung
N	(Lat.: numerus) Anzahl
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEC	Nekrotisierende Enterokolitis
NEO-KISS	Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen bei VLBW Frühgeborenen
NICU	Neonatal Intensive Care Unit
n.sign.	Nicht signifikant
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OP	Operation
OR	Odds Ratio
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PDA	Persistierender Ductus arteriosus
PVL	Periventrikuläre Leukomalazie
PEEP	Positive Endexpiratory Pressure
RDS	Respiratory Distress Syndrom
ROP	Retinopathy of prematurity
RT-PCR	Real-time PCR
SNP	Single nucleotid polymorphism
SP-A, -B, -C, -D	Surfactantproteine A bis D
SSW	Schwangerschaftswoche
TTF1	Thyroid Transkription Faktor 1
VLBW	Very Low Birthweight (<1500g)
WES	Whole-Exome Sequencing
WGS	Whole-Genome Sequencing
WPPSI-III	Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence
WHO	World Health Organization

# 1 Einleitung

## 1.1 Frühgeburtlichkeit

Eine verfrühte Geburt, definitionsgemäß eine Geburt vor der abgeschlossenen 37. Schwangerschaftswoche (SSW), betrifft mehr als eine von zehn Geburten, jährlich etwa 15 Millionen Geburten weltweit (WHO, 2018). Frühgeborene werden nach Geburtsgewicht in Extremely low birth weight (ELBW, <1000g), Very low birth weight (VLBW, <1500g) und Low birth weight (LBW, < 2500g) unterschieden (Speer, 2019). Während international ein Anstieg der Frühgeburtenzahlen zu verzeichnen ist, liegen diese deutschlandweit im letzten Jahrzehnt stabil bei 5-9%. Jedoch haben vor allem die extrem verfrühten Geburten unter der 28. Schwangerschaftswoche, mutmaßlich bedingt durch demographische Faktoren und Fortschritte in der Reproduktionsmedizin, deutlich zugenommen (IQTIG, 2017) (Dudenhausen et al., 2007). Frühgeburtlichkeit ist die häufigste Todesursache von Kindern unter 5 Jahren und die Prognose zu dessen Morbidität und Überleben ist – trotz optimaler Versorgung – immer noch wesentlich abhängig vom Gestationsalter (Wang et al., 2016). Durch die beträchtlichen medizinischen Fortschritte stehen Neonatologen gegenwärtig vor der Aufgabe Frühgeborene, deren Überlebensrate deutlich gestiegen ist, die jedoch ein erhöhtes Morbiditätsrisiko der Organsysteme haben, optimal zu versorgen (Van Wassenaer-Leemhuis et al., 2017) (Endesfelder, 2018).

Die Ätiologie potentieller Erkrankungen eines Frühgeborenen ist komplex. Neben der allgemeinen Unreife wirken sich auch umweltbedingte und genetische Merkmale auf das Morbiditätsrisiko aus. Die Erforschung der Morbiditätsursachen führt nicht nur zu einem besseren generellen Verständnis, sondern bietet auch eine wichtige Basis für die Entstehung spezifischer neuer Therapieoptionen und eines verbesserten Outcomes der Erkrankungen eines Frühgeborenen. Insofern eröffnet die Erforschung dieser Faktoren einen wichtigen Ausgangspunkt für die angestrebte bestmögliche Versorgung. Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, die komplexe genetische Ätiologie der pulmonalen Unreife des Frühgeborenen zu untersuchen, um zu einem besseren Verständnis des Krankheitsbildes des Atemnotsyndroms des sehr unreifen Frühgeborenen (VLBW) beizutragen.

## 1 Einleitung

### 1.2 Das Atemnotsyndrom Frühgeborener

Das Frühgeborene ist im Allgemeinen vulnerabel und seine Lunge dabei ein besonders gefährdetes Organ. Das durch Surfactantmangel und die pulmonale Unreife bedingte Atemnotsyndrom (ANS) oder Respiratory Distress Syndrome (RDS) wurde Ende der 50er Jahre durch Avery und Mead erstmalig beschrieben (Avery und Mead, 1959). Das Atemnotsyndrom des Frühgeborenen tritt in den entwickelten Ländern vor allem <33. SSW auf. Das Risiko steigt mit abnehmendem Gestationsalter. Der EuroNeoStat Report veröffentlichte Zahlen für 2010 mit einer ANS Rate von 92% der 24.-25. SSW, 88% der 26.-27. SSW, 76% der 28.-29. SSW und 57% der 30.-31. SSW der zu früh geborenen Neonaten (Euro Neo Stat, 2010). Die Zahlen sind in Deutschland stabil (Zeitlin et al., 2013). Durch das frühzeitige therapeutische Management ist gegenwärtig jedoch schwierig festzustellen, wie viele Frühgeborene tatsächlich ein ANS haben (Sweet et al., 2019). Die Mortalität konnte durch verbesserte Therapieoptionen in den letzten Jahrzehnten entscheidend gesenkt werden (Owen et al., 2017). Dennoch ist das ANS noch häufigste Ursache frühgeburtlichen respiratorischen Versagens und häufigste Todesursache bei Frühgeborenen (Sweet et al., 2019) (Sardesai et al., 2017).

#### 1.2.1 Klinik und Pathophysiologie

Die respiratorische Insuffizienz Frühgeborener ist charakterisiert durch einen primären Surfactantmangel. Pulmonales Surfactant, komplex zusammengesetzt aus Phospholipiden, Cholesterol und anderen neutralen Lipiden sowie Proteinen (Surfactantprotein-A, -B, -C und -D) kleidet die Lungenoberfläche in einer Monolayerschicht aus. Hinreichend wird Surfactant in den Typ 2 Pneumozyten der Lunge erst ab der 35. Gestationswoche gebildet (Speer, 2019). Reifgeborene haben einen Surfactant Pool von etwa 100mg/kg Surfactant, während Frühgeborene in etwa 4-5mg/kg bei Geburt aufweisen (Sardesai et al., 2017). Ein Mangel wirkt sich mit einer gesteigerten Oberflächenspannung, fehlender Stabilisation des Alveolarsystems und Kollabieren der Alveolen in der Expiration aus. Ohne Behandlung entstehen durch Leckage proteinreichen Exsudats hyaline Membranen, die den Sauerstoffaustausch mindern, ein Circulus vitiosus. Die unreife Lunge des Frühgeborenen mit einer physiologischen Destabilität des Gaswechselkomplexes, kleineren

## 1 Einleitung

Gasaustauschfläche und einer Entzündungsneigung ist dazu sehr leicht z.B. durch Sauerstoff und Beatmung verwundbar (Wauer et al., 2004).

Klinisch entwickeln die betroffenen Frühgeborenen Tachypnoe, knorksende Atmung, Einziehungen der Brustwand, Nasenflügeln und können während der angestregten Atmung eine Zyanose entwickeln. Bei fortschreitender Erkrankung entsteht Apnoe und ein respiratorisches Versagen ist möglich (Speer, 2013). Die Diagnose eines Atemnotsyndroms wird anhand des Silverman-Andersen Scores (Ausmaß der Einziehungen der Brustwand, Nasenflügeln, expiratorisches Stöhnen) (Silverman und Andersen, 1956), mit Hilfe der Blutgasanalyse (Hypoxie, Hyperkapnie) und anhand eines Röntgenbildes gestellt. Ein feingranulär-retikuläres Muster wird röntgenologisch bis hin zur weißen Lunge (Atelektasen) sichtbar. Das klassische Bild des ANS hat sich durch frühe Therapiemöglichkeiten mitzeitigem CPAP-Einsatz und früher Surfactantgabe verändert – die definierenden Kriterien sind aufgrund des pragmatischen klinischen Vorgehens zum Teil kuppert (Sweet et al., 2019). Komplikationen bedrohen das Frühgeborene mit Atemnotsyndrom akut mit Apnoe und respiratorischem Versagen auch in Form eines interstitiellen Emphysems oder Pneumothoraxes. Potentielle Langzeitmorbiditäten betreffen fast alle Organsysteme, neben Bronchopulmonaler Dysplasie (BPD) und Nekrotisierender Enterokolitis (NEC) besteht das erhöhte Risiko einer intra- und periventrikulären Blutung (IVH) (Speer, 2019).

### 1.2.2 Therapie

Während erste Langzeitbeatmungen Frühgeborener durch technische Entwicklungen Mitte der 50er Jahre des letzten Jahrhunderts möglich wurden, entdeckte George Gregory, ein Anästhesist, der in einer neonatologischen Arbeitsgruppe in San Francisco arbeitete, 15 Jahre später die positiven Effekte des kontinuierlich positiven Drucks (PEEP) zur Atelektasenreduktion. Durch diese Veränderung kam es zur ersten erfolgreichen Behandlungsmethode des Atemnotsyndroms, die zu einer ersten deutlichen Reduktion der Mortalität führte (Donald und Lord, 1953) (Gregory et al., 1971). Einen weiteren wichtigen Therapieerfolg erkannte Ende der 60er Jahre ein neuseeländischer Frauenarzt mit dem Zusammenhang einer besseren Lungenreife von Lämmern, deren Mütter Glukokortikoide verabreicht bekommen hatten (Liggins und Howie, 1972). Ende der 80er Jahre wurde die maternale prophylaktische Glukokortikoidtherapie standardmäßig 24-48 Stunden ante partum gängige Praxis und führte zur Besserung der Lungenreife Frühgeborener durch Induktion der Surfactant-

## 1 Einleitung

Synthese (Morales et al., 1986) (Ballard und Ballard, 1996) (Gortner und Herting, 2017). Selten konnten in der Medizin so große Fortschritte erzielt werden wie durch die Entdeckung von Surfactant 1929 durch Kurt von Neergaard (Neergaard, 1929). Bis zur klinischen Anwendung vergingen jedoch Jahrzehnte. Avery und Mead entdeckten die Verbindung zwischen Surfactantmangel und ANS Mitte/ Ende der 50er Jahre (Avery und Mead, 1959). 1980 war es erstmalig gelungen, exogenes Surfactant bei Frühgeborenen anzuwenden (Fujiwara et al., 1980a/b) (Obladen, 2005). Die Surfactanttherapie hat in der Neonatologie eine neue Ära eingeläutet; die akuten pulmonalen Komplikationen konnten um 2/3 reduziert, die Mortalität von Frühgeborenen mit ANS nahezu halbiert werden (Speer, 2019).

Derzeit beinhalten therapeutische Methoden vor allem das Ziel, einen Gasaustausch herzustellen, der die Organe des Frühgeborenen ausreichend mit Sauerstoff versorgt ohne seine vulnerable Lunge zu schädigen (optimale Sauerstoffdosierung, schonende Beatmungsverfahren) (Sweet et al., 2019). Diskutiert werden für diesen Zweck Indikation, Zeitpunkt, Dosis und Kombination der Applikationsformen von Surfactant (Tutdibi und Gortner, 2008) (Aldana-Aguirre et al., 2017). Die Verabreichung von Surfactant erfolgt intratracheal über einen Trachealtubus und kann seit etwa einer Dekade in einem neuen Verfahren auch über eine dünne Sonde unter Spontanatmung am CPAP verabreicht werden (engl.: LISA, less invasive surfactant application) (Kribs et al., 2010). Die in Deutschland derzeit verfügbaren Surfactantpräparate sind seit über 25 Jahren im Handel. Es sind das bovine Alveofact® (Bovactant) und das porcine Curosurf® (Poractant Alpha) (Gortner und Herting, 2017). Ob zukünftig synthetisch hergestelltes Surfactant, beispielsweise das aus SP-B und -C Analoga bestehende CHF5633 oder Surfaxin® (Lucinactant), ein Surfactantpräparat aus synthetisch produzierten Phospholipiden und 21 Aminosäuren, appliziert werden kann, ist Gegenstand derzeitiger wissenschaftlicher Untersuchungen (Seehase et al., 2012) (Sweet et al., 2017) (Gortner und Herting, 2017).

Ein weiterer Fokus gegenwärtiger Forschungsbemühungen beinhaltet Vorhaben, chronische Lungenschäden Frühgeborener durch lokal applizierbare Medikamente zu reduzieren. Die persistierende pulmonale Inflammation der Atemwege des Frühgeborenen, die durch Infektion, mechanische Beatmung und/ oder Sauerstoff beeinträchtigt ist, soll so reduziert werden (Saresai et al., 2017). Die tracheale postnatale Applikation von Glukokortikoiden (Budesonid) in Kombination mit

## 1 Einleitung

Surfactant (Survanta ®) wurde in einer großen multizentrisch klinischen Studie von Frühgeborenen mit Atemnotsyndrom untersucht. Eine signifikant reduzierte Zahl von Frühgeborenen erkrankte an Atemnotsyndrom, hatte pulmonalen Komplikationen oder entwickelte eine BPD. Wesentliche Nebenwirkungen, insbesondere der neurokognitiven Entwicklung, wurden nicht beobachtet (Nachuntersuchung im Alter von 2-3 Jahren) (Delara et al., 2018). Weitere kontrollierte Studien sind bis zur klinischen Anwendung dieser Therapie durch Fachgesellschaften gefordert worden (Gortner und Herting, 2017). Alternative Pharmaka mit Einfluss auf Lungenreparatur und Immunomodulation wie Stammzell-, Superoxid Dismutase (rhSOD)- und Clara cell secretory protein (rhCC10)- Therapien sind derzeitige experimentelle Forschungsvorhaben, die denkbare zukünftige Therapieoptionen ergeben können (Chang et al., 2014) (Davis et al., 2003) (Levine et al., 2005).

Die Zukunft des therapeutischen Ansatzes für das Atemnotsyndrom Frühgeborener ist ein Behandlungsansatz durch individualisierte medizinische Therapieentscheidung mit Surfactant als Vektor (Sardesai et al., 2017). Die Surfactantapplikation kann als Vektor mit Steroiden oder in Kombination mit Molekülen, wie dem Thyroidea-stimulierenden Hormon (TSH), Club Cell Protein-10 (rhCC-10) oder Ambroxol erfolgen, um den pulmonalen Behandlungserfolg zu verbessern (Zhou et al., 2017) (Sardesai et al., 2017).

Inwieweit die genetische Therapieforschung, beispielsweise als *precision medicine* zukünftig weitere kombinierte Therapieoptionen für den Neonatologen ergeben kann, ist offen und eine interessante Perspektive.

### 1.2.3 Multifaktorieller Kontext

Verschiedene umweltbedingte, demographische und genetische Einflussfaktoren prädisponieren zu einer Entstehung des Atemnotsyndroms. Einige Risikofaktoren sind gut bekannt: Höheres maternales Alter, die Geburt per (Not-) Kaiserschnitt, männliches Geschlecht (Dani et al., 1999) sowie Ethnie (Frühgeborene kaukasischer Herkunft gegenüber afro-amerikanischer Abstammung) (Fujikura und Froehlich, 1966) (Kavvadia et al., 1998) (Wallace et al., 2017), maternaler Diabetes mellitus (Matti et al., 1996), Präeklampsie, vorzeitiger Blasensprung und multiple Schwangerschaften (Anadkat et al., 2012) (Mehrabadi et al., 2016), Chorioamnionitis (Metcalf et al., 2017) und schwere Geburtskomplikationen wie Asphyxie und Hydrops fetalis (Hallman und Haataja, 2007). Protektiv wirkt sich die Frühgeburtlichkeit einer

## 1 Einleitung

Zwillings- vs. Einlingsgeburt (>32.SSW), eine maternale Hyperthyreose und die antenatale Glukokortikoidtherapie aus (Hallman und Haataja, 2007). Inwieweit dem ANS verglichen zwischen Früh- und Reifgeborenen verschiedene Einflussfaktoren zugrunde liegen wird erst begonnen zu verstehen und ist ein gegenwärtiger wissenschaftlicher Diskurs (Condo et al., 2017) (Mehrabadi et al., 2016).

### 1.2.4 Hereditäre Einflussfaktoren

Bekannt ist seit geraumer Zeit, dass ein erhöhtes Risiko für ein Atemnotsyndrom vorliegt, wenn ein Geschwisterkind bereits erkrankte (Nagourney et al., 1996). Die Heritabilität des ANS wurde 1971 in Zwillingsstudien gezeigt (Myriantopoulos et al., 1971). Mit der Beobachtung einer erhöhten Konkordanz von monozygoten gegenüber dizygoten Zwillingen kamen die Autoren zu dem Schluss, dass neben den bekannten Faktoren auch ein starker genetischer Einfluss das Auftreten des Atemnotsyndroms bedingt (van Sonderen et al., 2002) (Spiegler et al., 2012). Die genetische Suszeptibilität des ANS wird je nach Studie auf 35-65% geschätzt (Levit et al., 2009) (Shen et al., 2016).

Genetische Untersuchungen zum Atemnotsyndrom des Frühgeborenen sind bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt durch Kandidatengenstudien geprägt. Es werden dabei Gene oder Genvarianten untersucht, die funktionell zur Ätiologie der Erkrankung beitragen.

**Tabelle 1:** Kandidatengene mit postulierter Suszeptibilität zum ANS

Gen	Risiko / Protektives Allel oder Haplotyp	Referenzen
SP-A	*6A <sup>3</sup> und *1A <sup>1</sup> /*1A <sup>2</sup>	(Chang et al., 2016) (Floros, 2001)
	6A <sup>2</sup> ,6A <sup>4</sup> und 1A <sup>0</sup> ,1A <sup>5</sup> 186A/G	(Haataja et al., 2000) (Kala et al., 1998) (Marttila et al., 2003b) (Rämet et al., 2000) (Tsitoura et al., 2016)
SP-B	131Thr, Δ14del/ins,	(Chang et al., 2016) (Fatahi et al., 2017)
	1580C/T, 9306 A/G	(Floros et al., 1995) (Haataja et al., 2000) (Makri et al., 2002) (Marttila et al., 2003a) (Tsitoura et al., 2016)

## 1 Einleitung

**Tabelle 1:** Kandidatengene mit postulierter Suszeptibilität zum ANS:  
Fortsetzung

Gen	Risiko / Protektives Allel oder Haplotyp	Referenzen
SP-C	186Asn, 138 Asn, 186 rs1124	(Fatahi et al., 2017) (Lahti et al., 2004) (Rova et al., 2004)
SP-D	*rs1923537 G/G	(Hilgendorff et al., 2009)
GPRA	H4/5 (H1) Haplotyp	(Pulkkinen et al., 2006)
ABCA3	rs13332514 in Exon 10, TGAAG	(Karjalainen et al., 2008) (Tian et al., 2016)
IFN- $\gamma$	IFN $\gamma$ <sup>+874</sup> A	(Bokodi et al., 2007)
ACE	D/D	(Harding et al., 2003) (Yanamandra et al., 2004) (Yimenicioglu et al., 2011)
FGFR-3, - 4, -7	rs10796856, rs1966265, rs4316697	(Rezvani et al., 2013)
MMP-1, -9, -12	rs7125062, rs20544, rs652438	(Rezvani et al., 2013)
GR $\alpha$ , GR $\beta$	*GR $\alpha$ -, *GR $\beta$ - Expression	(Ataseven et al., 2017)
CYBA	C242T	(Huizing et al., 2017)
IL-10	1082G/A*	(Khoshdel et al., 2017)
ROCK1,2	rs2271255, rs35996865, rs726843, rs2290156, rs10178332, rs35768389	(Kaya et al., 2017)

Modifiziert nach (Hallman und Haataja, 2007), \*: *protektiv*

Als erste Klasse der bekannten genetischen Einflussfaktoren sind seltene Surfactantmutationen bedeutsam, die ein schweres respiratorisches Versagen durch Surfactantfehlfunktionen nach der Geburt bedingen können. Auch klinisch variable und leichte Verläufe dieser Varianten sind beschrieben worden. Die Mutationen betreffen verschiedene Proteine des Surfactants (SP-B, SP-C), ATP-bindenden

## 1 Einleitung

Kassettenreporter 3 (ABCA3), das als Transporter des Surfactantmetabolismus bedeutsam ist sowie Thyroidalen Transkriptionsfaktor 1 (TTF1), das die Expression des Surfactants kontrolliert. Außerdem sind Assoziationen zu dem Granulozyten-Monozyten-Kolonie-Stimulierenden-Faktor (GM-CSF) und Forkhead Box F1 (FOXF1) (Funktion in der pulmonalen Angiogenese) beschrieben worden (Nogee et al., 1993) (Jo, 2014) (Hamvas et al., 2007) (Boggaram, 2009) (Whitsett et al., 2015). Für sämtlich genannte Mutationen wurden vor allem Fälle reifer Neugeborener in der Literatur veröffentlicht.

Der hereditäre SP-B Mangel (Nogee et al., 1993), mit einer Häufigkeit von 0-0.4% angegeben (Garmany et al., 2008), kann durch eine homozygote „loss-of-function“ Mutation zu raschem respiratorischen Versagen mit fatalem Verlauf ohne Lungentransplantation führen. Innerhalb der bisher über 30 beschriebenen Varianten (Jo, 2014) finden auch mildere Mutationsformen Erwähnung (Dunbar et al., 2000). Weiterhin sind sporadische, meist spontan auftretende, dominante SFTPC Mutationen bekannt, die für die Vorläufer (proSP-C) des SP-Cs kodieren. Im Gegensatz zum SP-B Mangel ist die Penetranz variabel und das klinische Bild reicht von schwerem RDS des Neugeborenen bis zur chronischen interstitiellen Lungenerkrankung des Erwachsenen oder sogar asymptomatischem Verlauf. Es sind über 35 verschiedene Mutationen bekannt (Jo, 2014). Die meist familiär gehäuft auftretenden, über 70 (Hamvas et al., 2007) beschriebenen ABCA3 Mutationen haben eine ähnliche klinische Variabilität wie die SFTPC Varianten (Brasch et al., 2006) (Bullard et al., 2005). Neben regulierenden Transkriptionsfaktoren der Surfactantsynthese spielt TTF-1 eine Rolle für die Lungendifferenzierung (Boggaram, 2009). Es sind Mutationen beschrieben, die zu respiratorischem Versagen in der Neugeborenenperiode und interstitieller Lungenerkrankung bei älteren Kindern führen können (Hamvas, 2012).

Die zweite Klasse der genetischen Faktoren mit Einfluss auf das Auftreten des Atemnotsyndroms sind Varianten, die insbesondere das ANS des Frühgeborenen beeinflussen. Nach diesen genetischen Risikoassoziationen wurde verstärkt in den letzten 10 Jahren gesucht. In einer Reihe von Kandidatengenstudien konnten zum ANS disponierende als auch protektive Polymorphismen gefunden werden, die die Surfactantfunktion und -struktur (SP-A, -B, -C und -D sowie ABCA3) pulmonale Differenzierung (G-Protein gekoppeltes Rezeptorgen mit Asthma Suszeptibilität (GPRA), Sodium Channel Epithelial 1 Alpha Subunit (SCNN1A)) und inflammatorische Antwort (Interferon Gamma (IFN- $\gamma$ ), Angiotensin Converting Enzyme

## 1 Einleitung

Gen (ACE), Interleukin 10 (IL10), Glukokortikoidrezeptor ( $GR\alpha$ ,  $GR\beta$ ) betreffen. Auch Wachstums- (Growth Factor Receptor (FGFR)) und oxidative Stressfaktoren (Cytochrom B-245 Alpha Kette (CYPA)) sowie Zellregulationsmechanismen (Rho-Kinase (ROCK1 und ROCK2)) und Proteinstoffwechselfaktoren (Matrix-Metalloproteasen (MMP-1, -9, -12)) sind mit einer Suszeptibilität zum Atemnotsyndrom Frühgeborener beschrieben worden. Tabelle 1 gibt einen Überblick über bisher publizierte Studien für Frühgeborene.

Zu Surfactantstruktur und -funktion sowie pulmonaler Differenzierung sind diverse Untersuchungen veröffentlicht. Genetische Veränderungen der Surfactantproteine SP-A, SP-B und SP-C Frühgeborener wurden von Hallman und Haataja (2007) zum Atemnotsyndrom untersucht. Während SP-A Allele  $6A^2$  und  $1A^0$  sowie  $6A^4$ ,  $1A^5$  und  $186A/G$  als Risikoallele für das Auftreten des ANS publiziert worden sind, zeigen weitere Studienergebnisse, dass die Allele  $6A^3$  und  $1A^1/1A^2$  eher einen protektiven Effekt ausüben (s. Tab. 1). Im Gegensatz dazu wurden in einer finnischen und einer koreanischen Publikation die protektiv beschriebenen Allele des SP-A wiederum als Risikofaktor für das Auftreten eines ANS veröffentlicht (Marttila et al., 2003a) (Jo et al., 2013). Eine chinesische Arbeitsgruppe beschrieb Polymorphismen der Surfactantproteine-A ( $186 A/G$  und  $655C/T$ ) sowie -B ( $1580C/T$ ) assoziiert zum ANS des Frühgeborenen (Chang et al., 2016). Für das Surfactantprotein-B wurden Risikoallele  $9306 A/G$  und  $Ile131Thr$  (Fatahi et al., 2017) (Marttila et al., 2003a), für das SP-C die Risikopolymorphismen  $186 Asn$  (Lahti et al., 2004) und  $rs1124$  (Fatahi et al., 2017) und für das SP-D das protektive Allel  $rs1923537 G/G$  (Hilgendorff et al., 2009) mit einer Suszeptibilität zu dem Auftreten eines ANS Frühgeborener publiziert. Weitere Arbeitsgruppen untersuchten Varianten des ATP-bindenden sogenannten Kassettentransporters, ABCA3. ABCA3 wird nur in der Lunge in den Alveolaren Typ II Zellen exprimiert und spielt eine zentrale Rolle in der Surfactant Homöostase (Bullard et al., 2005). Früh- und Reifgeborene wurden untersucht, die Studienergebnisse zeigen zwei Risikopolymorphismen für das Auftreten eines ANS Frühgeborener (Karjalainen et al., 2008) (Tian et al., 2016). Eine Prädisposition zum Atemnotsyndrom Frühgeborener  $>32$ . SSW wurde des Weiteren für das Risikoallel  $H4/5$  ( $H1$ ) des GPRA Gens, einem für eine Asthma Suszeptibilität bekannten G-Protein Rezeptor, veröffentlicht (Pulkkinen et al., 2006). Weiterhin wurde die Lungenflüssigkeitsabsorption kontrollierende Natrium Channel Epithelial 1 Alpha Subunit (SCNN1A) untersucht. Eine Arbeitsgruppe prüfte den Zusammenhang zum

## 1 Einleitung

ANS Frühgeborener und fand keine Assoziation, jedoch eine signifikante Assoziation zu der Reifgeborenenkohorte (Li et al., 2015).

Weitere nachfolgende Untersuchungsergebnisse liegen zu genetischen Regionen, die die inflammatorische Antwort betreffen, zu dem Atemnotsyndrom Frühgeborener vor. Eine britische Arbeitsgruppe beschrieb ein höheres Risiko für ein ANS von Frühgeborenen zwischen der 28.-32. SSW mit einem ACE DD Genotyp, in einer darauf folgenden Studie konnte keine Assoziation diesbezüglich gefunden werden (Harding et al., 2003) (Yanamandra et al., 2004). Bei Frühgeborenen mit höherer Glukokortikoid Rezeptor Expression (GR Alpha, GR Beta) konnte eine signifikant niedrigere ANS Rate nachgewiesen werden (Ataseven et al., 2017). IFN $\gamma$ <sup>+874A</sup> Allelträger VLBW Frühgeborene wurden in einer ungarischen Arbeitsgruppe untersucht, sie zeigten eine signifikant höhere ANS Rate (Bokodi et al., 2007). Für Interleukin 10 (IL10) -1082 G/G Allelträger, Frühgeborene einer iranischen Population, wurde ein signifikant niedrigeres Risiko ein ANS zu entwickeln publiziert (Khoshdel et al., 2017).

Diverse weitere Untersuchungen beschreiben Assoziationen zum Atemnotsyndrom Frühgeborener an funktionell unterschiedlichen genetischen Regionen. Das Growth Factor Receptor (FGFR) Gen kodiert für einen Wachstumsfaktorrezeptor und mehrere Varianten (in FGFR-3,-4,-7) sind in Zusammenhang zu dem Auftreten eines ANS bei Frühgeborenen unter der 28. Schwangerschaftswoche veröffentlicht worden (Rezvani et al., 2013). Eine Oxidase, die mehrere Konditionen bei oxidativem Stress steuert ist die Cytochrom B-245 Alpha Kette (CYPA). Für Frühgeborene <30. Gestationswoche mit einem ANS beschrieb eine Arbeitsgruppe eine Assoziation des C242T Polymorphismus von CYPA (Huizing et al., 2017). Weiterhin wurden mit einer erhöhten Suszeptibilität zum ANS Frühgeborener verschiedene Risikoallele der Rho-Kinase (ROCK1 und ROCK2), die an der Regulation verschiedener Zellfunktionen beteiligt ist und Risikoallele der Matrix-Metalloproteasen (MMP-1,-9,-12), die an Spaltungen von Peptidbindungen beteiligt sind, publiziert (Kaya et al., 2017) (Rezvani et al., 2013).

In vielen Fällen konnten die Ergebnisse der Kandidatengenstudien Frühgeborener zum ANS in einer erneuten wissenschaftlichen Kohortenuntersuchung nicht bestätigt werden, wie beispielsweise bei der erneuten Untersuchung des ACE DD Genotyps (Harding et al., 2003) (Yanamandra et al., 2004) (Jo et al., 2013). Die Ursachen für diese widersprüchliche Studienlage liegen zum einen in der Replikationsgröße. Eine

## 1 Einleitung

ausreichende Replikationsgröße ist für Kandidatengenstudien besonders entscheidend, da sonst eine Assoziation nicht wissenschaftlich haltbar ist. Hallman kommt in seinem Übersichtsartikel zu dem Schluss, dass, um aussagekräftige Ergebnisse zum Atemnotsyndrom und seinen genetischen Risikofaktoren zu ermöglichen, die bisher publizierten Kandidatengenstudien und gefundenen Assoziationen in ausreichender Populationsgröße noch bestätigt werden müssen (Hallman und Haataja, 2007). Zudem lassen die nicht replizierbaren Resultate vieler Kandidatengenstudien jedoch auch schlussfolgern, dass dem Atemnotsyndrom des Frühgeborenen möglicherweise eine komplexere genetische Ätiologie zugrunde liegt, als bis dato angenommen.

Die Grundlage des Ansatzes der komplexen Ätiologie von Krankheiten eines Frühgeborenen bildet der Vergleich der Phänotypen des ANS extrem Frühgeborener zu Reifgeborenen. Genetisch als auch umwelt- und konstitutionell bedingt bilden diese verschiedene Krankheitsentitäten (Hallman und Haataja, 2007). Während der evolutionäre Vorteil eines Neugeborenen durch erfolgreiche postnatale Adaptation bestimmt war, wurde die Prognose und Lebensfähigkeit Frühgeborener durch neue Therapiemethoden erst innerhalb der letzten 60 Jahre drastisch verbessert. Insofern stand die Entwicklung des ANS bei Frühgeborenen nicht unter Selektionsdruck: Der Phänotyp ist im Vergleich zu (Fast-) Reifgeborenen verschieden und genetische Einflussfaktoren weisen bei Frühgeborenen eine hohe Frequenz und geringe Penetranz auf, sie sind komplex (Marttila et al., 2003a).

## 1.3 Genetik

### 1.3.1 Polygene Merkmalsvererbung

Es wird mittlerweile angenommen, dass einigen Erkrankungen eher eine komplexere, multifaktoriell und polygene Vererbung zugrunde liegt (Leu et al., 2012). Kennzeichnend ist nicht ein durch dominant oder rezessiv Mendel'schen Erbgang bestimmtes Merkmal, sondern genetische Varianten, die das Risiko einer Erkrankung oder eines Merkmals neben weiteren Einflussfaktoren wahrscheinlicher machen (Hunter, 2005). Ein genetischer Erklärungsansatz für komplexe Erkrankungen ist zum einen eine „common disease / multiple rare variant“- (CD/MV-) Hypothese: Seltene genetische Faktoren mit großem Einfluss, welche in Kandidatengenstudien und Sequenzierungsanalysen oder Kopplungsstudien untersucht werden (Frequenz <1%,

## 1 Einleitung

OR>2) (Lohmüller et al., 2003). Kandidatengenstudien erfassen nur einen Bruchteil möglicher Risikofaktoren multifaktoriell bedingter Krankheiten (Hirschhorn, 2005). Zum anderen geht die „common disease / common variant“- (CD/CV-) Hypothese von häufig in der Population zu findenden genetischen Veränderungen mit geringem Effekt aus (Frequenz >1%, OR <2) (Pritchard und Cox, 2012) (Leu, 2012). Untersuchungsinstrument für die (CD/CV-) Hypothese sind Assoziationsuntersuchungen wie die Genomweite Assoziationsanalyse (GWA), das Whole Exome Sequencing (WES) oder Whole Genome Sequencing (WGS) (Manolio et al., 2009) (Meienberg et al., 2016).

### 1.3.2 Das menschliche Genom und seine Variationen: Einzelnukleotid-Polymorphismen

Das menschliche Genom bezeichnet die Gesamtheit der genetischen und damit vererbaren Information und ist in jeder humanen Zelle, außer den roten Blutkörperchen, enthalten.

Die menschliche Art ist auf Genomebene 99,9% homogen – die Abfolge der insgesamt über 3,3 Milliarden Basenpaare also zu großen Teilen identisch (Harding, 2007). Es gibt jedoch Variationen: Deren größter Anteil, ca. 90%, machen Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl.: single nucleotide polymorphism, SNP) aus (Collins et al., 1998). Ein SNP liegt vor, wenn eine Base durch eine andere ersetzt wurde und sich diese Variation mit einer gewissen Häufigkeit in der Population durchgesetzt hat. So trägt die Frequenz des weniger häufigen Allels, die Minor Allel Frequenz (MAF), mindestens 1% der Bevölkerung (Venter et al., 2001). SNPs treten unregelmäßig auf, im Durchschnitt etwa alle 100-300 Basenpaare im Genom. Sie sind selten in kodierenden Bereichen lokalisiert, insgesamt nur 3-5% der humanen DNA-Bereiche kodiert für Proteine. Die Mechanismen zwischen den SNPs werden mithilfe des sogenannten Kopplungsungleichgewichts (engl.: linkage disequilibrium (LD)) beschrieben. Dieses besagt, dass zwei Allele an zwei aneinander angrenzenden Genorten verhältnismäßig öfter zusammen zu finden sind, als es zufallsbedingt durch Rekombination in der Population auftreten würde (Laszlo et al., 2013). Räumlich nah beieinanderliegende Allelsequenzen im Chromosom werden generationsübergreifend meist gemeinsam, als sogenannter Haplotyp, vererbt.

Eine eindeutige Identifikation eines SNPs erfolgt durch die Angabe der rs-Nummer, die durch das National Center for Biotechnology Information (NCBI) vergeben wird.

## 1 Einleitung

Neben der Analyse von Populationen und Phänotypen mit Hilfe von wenigen SNPs ermöglicht der technische Fortschritt mittlerweile auch umfassendere Ansätze. Eine neue Ära für genetische Untersuchungen komplexer Erkrankungen wurde durch die Sequenzierung des menschlichen Genoms eingeläutet. Durch das internationale HapMap-Konsortium (The International HapMap Consortium, 2007) und das 1000 Genom Projekt (Lander et al., 2001) (Venter et al., 2001) (The 1000 Genomes Project Consortium, 2012) lagen erstmalig zuverlässige Informationen über SNPs des menschlichen Genoms vor (Heßler, 2013).

### 1.3.3 Genomweite Assoziationsstudien

Die Genomweite Assoziationsstudie (engl.: genome-wide association (GWA) study) ist ein methodischer Ansatz zur Identifizierung der Ursachen multifaktoriell bedingter Krankheiten (Ziegler, 2009) (Hessler, 2013). Hypothesenfrei werden häufige genetische Variationen im gesamten Genom untersucht, um genetische Variationen mit beobachtbaren Merkmalen zu identifizieren (National Institute of Health, 2017) (Hirschhorn, 2005).

Im Genom werden SNPs unabhängig von Hypothesen systematisch über sogenannte Mikroarrays Chip-gescannt (Ziegler, 2009). Bedingt durch den hohen Bestand der genetischen Marker (SNPs) beruht die GWAS auf dem Konzept der indirekten Assoziation, dem Kopplungsungleichgewicht (LD). Das bedeutet, dass einzelne SNPs nicht zwangsläufig primär kausal für eine Morbidität sind. Vielmehr ist das Konzept, dass sie unweit funktioneller Variationen lokalisiert sind und aufgrund des LD mit der Morbidität assoziiert sind (Herzog, 2012) (Hessler, 2013).

Liegen die Ergebnisse des Mikroarray Verfahrens vor, wird die Häufigkeit der genetischen Veränderungen populationsbasiert mit jeweils gleicher Gewichtung mit denen des definierten Phänotyps verglichen (Ziegler und König, 2010). Ist das Ergebnis signifikant, spricht man von einer genetischen Assoziation. Die Schwelle zu einer genomweiten Signifikanz liegt dabei bei einem p-Wert von  $5 \times 10^{-8}$  (Kriebel et al., 2012).

Bei vielen polygenen Erkrankungen führte die GWA Analyse zur Entdeckung neuer genetischer Assoziationen, wie etwa beim Asthma bronchiale (Ferreira, 2017). Auch komplexe Merkmale wie Atopien können untersucht werden (Kriebel et al., 2012).

## 1 Einleitung

Bisher ist noch keine GWAS zu einer neonatalen respiratorischen Erkrankung publiziert worden.

### 1.4 Fragestellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, hypothesenfrei genetische Faktoren zum Auftreten des Atemnotsyndroms des Frühgeborenen zu identifizieren, um zu einem besseren Verständnis der Ursachen dieses Krankheitsbildes beizutragen. Hierzu wurde eine GWAS zum Atemnotsyndrom bei VLBW Frühgeborenen durchgeführt. Folgende Fragestellungen werden in der vorliegenden Arbeit untersucht:

Gibt es häufige genetische Faktoren, die einen Einfluss auf die Entstehung des ANS bei extrem Frühgeborenen haben?

Können mit der „common disease / common variant“- (CD/CV-) Hypothese einer GWAS erbliche Merkmale identifiziert werden, die mit der externen Surfactantapplikation in Zusammenhang stehen?

Können in einem unabhängigen Frühgeborenenkollektiv gefundene Assoziationen bestätigt werden?

## 2 Patienten, Material und Methoden

### 2.1 Studienpopulation

Das Deutsche Frühgeborenenetzwerk „German Neonatal Network“ (GNN) ist eine populationsbezogene Kohortenstudie, die umfangreich ante- und postnatale Daten Frühgeborener mit einem Gestationsalter unter 36+6 Schwangerschaftswochen und einem Geburtsgewicht unter 1500 Gramm (VLBW) erfasst. In der vorliegenden Untersuchung konnten VLBW Frühgeborene, die von Dezember 2009 bis September 2015 geboren wurden, rekrutiert werden. Insgesamt wurden 7481 VLBW Frühgeborene aus 57 deutschen neonatologischen Kliniken eingeschlossen.

Ausgeschlossen aus den Untersuchungen wurden Neugeborene, die aus anderen Kinderkliniken verlegt wurden sowie Frühgeborene mit letalen genetischen Erkrankungen (z.B. Trisomie 13).

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Frühgeborenen zu dem Atemnotsyndrom zu untersuchen. Als Parameter für das sichere Vorliegen eines Atemnotsyndroms wurde die exogene Surfactantapplikation definiert („Exogene Surfactantapplikation ist erfolgt: JA/NEIN“).

### 2.2 Erhebung Klinischer Daten

Die gesammelten klinischen Daten über antenatale Therapie, Geburtsumstände, postnatalen Verlauf sowie postnataler Behandlung bis zur Entlassung wurden in drei standardisierten Fragebögen erfasst. Neben zwei Mundschleimhautabstrichen von Kind und Mutter asservierten die erstversorgenden Kolleginnen und Kollegen bei Möglichkeit auch ein kurzes Stück der Nabelschnur des Kindes nach dem Durchtrennen.

Nach ausführlicher Aufklärung und Zustimmung der Eltern zur Teilnahme wurde der erste Datenbogen (1/3) sowie Mundschleimhautabstriche und Nabelschnur in die Studienzentrale nach Lübeck gesandt. In Lübeck wurde jedem Patienten eine anonymisierte Nummer zugeordnet, um ohne Namen und Geburtsdatum die DNA zu isolieren und zu archivieren. Den zweiten (2/3) und dritten (3/3) Bogen schickten die Zentren nach der Entlassung. Die Bögen wurden anonymisiert in eine Access-

## 2 Material und Methoden

Datenbank eingegeben. Es erfolgte eine doppelt kontrollierte, personell sowie computerbasierte Prüfung des Datensatzes; im jährlichen Monitoring prüfte die Daten des Weiteren ein GNN-Arzt aus Lübeck in den Kliniken.

Um die Langzeitentwicklung nachzuverfolgen, wurden Eltern und ehemalige Frühgeborene im Alter von 5-6 Jahren in einer repräsentativen Zufallsauswahl zu einer standardisierten Untersuchung und Befragung schriftlich sowie, falls eine Telefonnummer vorhanden war, telefonisch eingeladen. Bei Einverständnis bekamen die Eltern vorab einen Elternfragebogen aus der „Studie für Kinder und Jugendliche in Deutschland“ ([www.kiggs.de](http://www.kiggs.de)) zugesandt. Die KIGGS Studie ist eine bundesweite Gesundheitsstudie mit über 17.000 teilnehmenden Kindern aus über 160 deutschen Städten und bietet einen Vergleich zur Durchschnittspopulation. Die Themen des Fragebogens enthielten neben der Erfassung körperlicher Beschwerden unter anderem soziale Faktoren, Ernährung, Bildung, Inanspruchnahme medizinischer Leistungen und familiäre Faktoren. Der Fragebogen war um spezielle Fragen zu Folgen der Frühgeburtlichkeit erweitert. In den heimatnahen Kliniken wurden Kinder und ihre Eltern zu einer Untersuchung eingeladen, deren Bestandteil ein ärztliches Interview, standardisierte körperliche, insbesondere neurologische Untersuchung, Testung der Lungenfunktion sowie ein Hör- und Sehtest war. Die kognitive Leistungsfähigkeit wurde mit dem Wechsler-Entwicklungstest WPPSI-III (Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence) und die motorische Entwicklung mit dem mABC (Movement Assessment Battery for Children) gemessen.

Die Studie wurde durch die örtliche Ethikkommission positiv beschieden (Aktenzeichen 08-022, Ethikkommission Lübeck).

### 2.3 Isolierung und Aufbereitung genomischer DNA

Die DNA der neonatalen und maternalen Mundschleimhautabstriche bzw. Nabelschnurproben wurde mittels DNA Mini Kit® (QIAGEN) und Genra Puregene Tissue Kit® (QIAGEN) in Lübeck extrahiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C asserviert. Da DNA aus Nabelschnurproben höher konzentriert ist, wurde diese, falls möglich, bevorzugt verwendet.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte fluorometrisch mittels des Quant-iT™ Pico-Green® Kits der Firma Invitrogen. Die Protokolle zur Isolierung genomischer DNA aus Nabelschnur- und Mundschleimhautabstrichen sind dem Anhang (s. 7.1) zu entnehmen.

### 2.4 DNA-Sequenzierung und SNP-Genotypisierung

Die DNA-Sequenzierung und SNP-Genotypisierung beruht auf dem Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion („polymerase chain reaction“, PCR). Enzymatisch werden in vitro spezifische DNA Bereiche in thermischen Zyklen exponentiell vermehrt (Nature, 2018). Denaturiert die DNA-Doppelhelix physikalisch durch hohe Temperatur in Einzelstränge, folgt während des Annealings bei niedrigerer Temperatur das Anlegen der Primer, kontemplärer Oligonukleotide, an spezifisch passende DNA-Regionen. Die thermostabile DNA-Polymerase kann im nächsten Schritt selektiv diese bestimmten Regionen in der Extensionsphase in 5'-3' Richtung amplifizieren, indem kontemplär Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) angelagert werden.

#### 2.4.1 Chip-Genotypisierung

Für die GWAS erfolgte die Genotypisierung 1272 VLBW Frühgeborener des Geburtsjahres 2009-2010 mit Hilfe des AXIOM™ Genome-wide CEU 1 Array Plates 2.0 im Cologne Center for Genomics der Universität zu Köln (Labor von Prof. Nürnberg).

Das Array umfasst insgesamt 587.353 SNPs pro DNA. Die Arraydatenbank wurde aus den bereits validierten Daten des HapMap Projekts, der Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) und des 1000 Genomes Projektes selektiert und durch Imputation auf ca. 7 Mio. SNPs erweitert (de Bakker et al., 2008). Die Genotypisierung beruht auf dem Prinzip der DNA-Chip-Technologie.

Die genomische DNA wird in diesem Verfahren nach Amplifikation mittels PCR durch den Einsatz spezifischer fluoreszenzmarkierter Primer in 25 bis 125 Basenpaarlängen fragmentiert, purifiziert und hybridisiert. Mittels multikolorischer Ligation werden die Nukleotide im Anschluss fluoreszenzmarkiert und können auf dem GeneTitan® MC Instrument erfasst werden.

#### 2.4.2 SNP-Genotypisierung

Zur Validierung der Ergebnisse wurden basierend auf ihren p-Werten ausgewählte auf genetische Assoziation getestete „Top-Hit“ SNPs der Genomweiten Assoziationsstudie in einem Allelischen Diskriminierungs Assay (TaqMan® SNP

## 2 Material und Methoden

Genotyping Assay, Applied Biosystems) in einer unabhängigen Kohorte von 2112 Frühgeborenen repliziert. Die Replikation ist definiert als Nachweis einer identischen genetischen Assoziation in einer unabhängigen Gruppe unter gleichen Bedingungen (Clarke et al., 2007). So konnte die Allelfrequenz ausgewählter, mit Verdacht auf genetische Assoziation bestehender SNPs bestimmt werden (s. Tab. 2, 3, 4 und 5). Bereits in die GWAS eingeschlossene Frühgeborene (s. 2.5.1) wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Das Verfahren zum Nachweis von bekannten Einzelnukleotid-Austauschen beruht auf dem Prinzip der quantitativen Echtzeit-PCR (engl.: real-time quantitative PCR, RT-PCR), indem die Amplifikation jedes PCR Zyklus durch fluorogene frequenzspezifische Oligonukleotidsonden quantifiziert wird (TaqMan® Sonden).

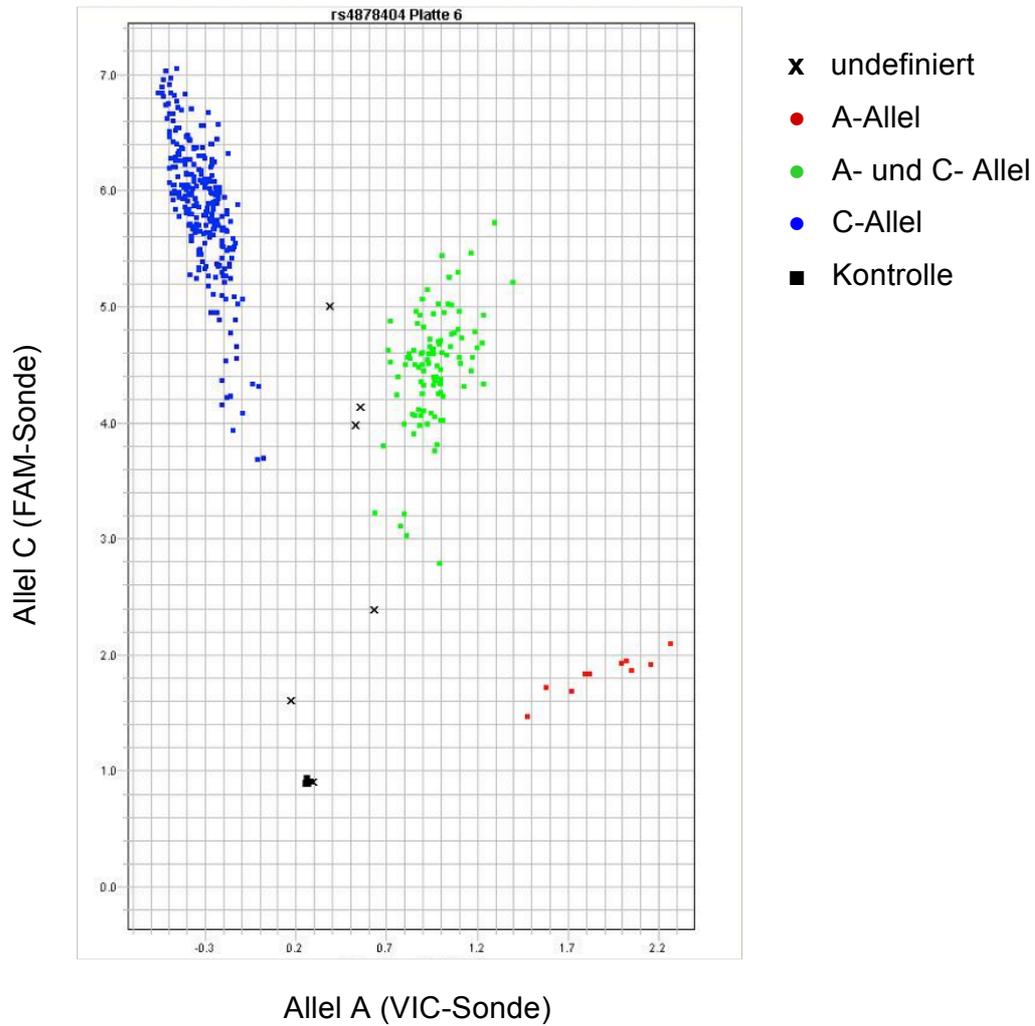
Diese Sonden sind an ihrem 5'Ende mit einem fluoreszenten Reporterfarbstoff (VIC® (2'-Chloro-7'-Phenyl-1,4-Dichloro-6-Carboxy-Fluorescein) und FAM™ (6-Carboxyfluorescein)) und an dem 3'Ende mit einem Fluoreszenzlöcher (engl.: quencher) (Rhodaminderivat) markiert, der die Emittierung des Reporterfarbstoffs unterdrückt, solange eine räumliche Nähe gegeben ist.

Während der PCR hybridisiert nach der Denaturierung in Einzelstränge zunächst neben den Primern die fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde allelspezifisch an den entsprechenden SNP (engl.: Annealing). In der folgenden Extensionsphase (engl.: Elongation) beginnt die AmpliTaq-DNA-Polymerase die TaqMan®Sonde zu verdrängen. Dadurch wird die TaqPolymerase 5'-3'-Exonukleaseaktivität aktiviert, die die Sonde vom DNA-Strang hydrolisiert und trennt. Die räumliche Nähe des Quenchers und Fluoresphors wird unterbrochen. Somit kann die Fluoreszenz mit entsprechend angeregter Wellenlänge im TaqMan Gerät Zyklus für Zyklus in einer Photozelle gemessen werden (TaqMan 7900 Fast Real-Time PCR System®, Applied Biosciences).

Konnte eine Sonde aufgrund nicht passender Allelfrequenz an einem SNP nicht hybridisieren, bleibt sie intakt und es wird eine andere Fluoreszenz gemessen. Liegt beispielsweise ein A/T SNP vor, sind 3 verschiedene Genotypen möglich. Während homozygote Allelträger eine rein einfarbige Fluoreszenz emittieren, tragen heterozygote Träger eine Mischfluoreszenz. In Form von Wolken, den sogenannten Clusterplots (s. Abb. 1) können in der graphischen Abschlussanalyse die Ergebnisse einem entsprechenden Genotyp zugeordnet und mithilfe der Sequence Detecting – System Software dargestellt werden (SDS 2.2.2®, Applied Biosciences). Neben der

## 2 Material und Methoden

automatisierten Messung erfolgte eine manuelle Kontrolle von Negativkontrollen, um Kontaminationen auszuschließen.



**Abbildung 1:** Cluster Plot von SNP rs4878404

Allelische Diskriminierung: Darstellung des SNPs rs4878404, rote und blaue Wolke entspricht homozygoten, grüne Wolke heterozygoten Allelträgern, schwarze Punkte sind keiner Kategorie zugehörig.

## 2 Material und Methoden

**Tabelle 2:** GWA „Top-Hit“ SNPs zur Genotypisierung mit fluoreszenzmarkierten Gensonden

rs17013394	AACCTTCTAGTCTGTCACTCCTAAA[C/T]ATCCAAGGGCTTCCAGAGGCTCTCT
rs13134269	ACGTGAGAAAGCCATGACTTCACAA[C/T]GTGTAAAGCATGTGCTGATAGCTTG
rs7593216	GGTTAAGAAGAGATGAACACACATA[C/T]ATCAACTCCTTCTTACTTAGCTCCC
rs923143	ACTGGGAATGCTCTCAGGGACAACG[C/G]CAGCCTGGAGTGAGGGAGCAGGATC
rs1385731	GGGTATATGGGCAGACATAAAGTGG[A/G]CAGGTAAAAATGTAAATGAAAGTTG
rs745929	TTGATCCTCTGCTGCGAATGCGAAG[G/C]GCACCATTTCCAAATACAGAGTCCT
rs4878404	AGAAAAAATAGATAGTCAGTTTATT[A/C]TGAAAGGTTAATCAATAACCTCCAT
rs629367	TGCAGCATTTTTGTGACAATGGACA[A/C]CTGATATACTGAATCCCTCAAAGCC
rs76084898	GGCACATGGCAGTGATGAGACATCA[G/T]GCTCCTTCCACTTGACTGCTGGAGA
rs77219825	TGTAGGAGGGCCAAGGGAAGGGGTG[A/T]GTCTCAAAGAGCCCCAGAGAGTCAT

**Tabelle 3:** Allelischer Diskriminierungs-Assay

Produkt	Firma	µl pro Well (384 Well Platte)
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X), No AmpErase UNG	Applied Biosystems	2,5
40X SNP Genotyping Assay®	Applied Biosystems	0,1
DNase freies Aqua, Ampuwa®	Fresenius Kabi	2,4
Vorgelegte luftgetrocknete Proben DNA (5ng/µl)		2 (Mundschleimhaut) 1 (Nabelschnur)

## 2 Material und Methoden

**Tabelle 4:** PCR Zyklen

9800 Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems)	Temperatur [C°]	Zeit
Initiale Denaturierung, Aktivierung AmpliTaq Gold Polymerase®	95	10 Minuten
Denaturierung*	92	15 Sekunden
Annealing/Elongation*	60	1 Minute
Final step „store forever“	4	∞

\*Zyklen: 45x bei Abstrich-, 40x bei Nabelschnur-DNA

**Tabelle 5:** Protokoll weiterer Geräte

Material / Gerät	Hersteller / Firma
Mega Block 96 Well Platte	Sarstedt, Nümbrecht
384 Well PCR Platte	Sarstedt, Nümbrecht
Achtkanalpipette Eppendorf® Xplorer	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf® Multipipette-Stream Advanced	Combitips Eppendorf, Hamburg
Vortex Genius 3	IKA, Staufen
Sealing Tape optically clear	Sarstedt, Nümbrecht
TaqMan HT 7900	Applied Biosystems, Foster City, CA
Rotanda 46 RSC Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen

## 2.5 Statistische Analysen

### 2.5.1 Berechnung der GWAS

Die statistischen Erhebungen der GWAS erfolgten in Kooperation des Institutes für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität Lübeck durch Dr. rer. nat. Michael Preuss.

## 2 Material und Methoden

### 2.5.1.1 Qualitätskontrolle vor statistischen Analysen

Von der Assoziationsanalyse wurden Frühgeborenenproben ausgeschlossen, bei denen unter 97% der Genotypen bestimmt werden konnten, da eine nicht adäquate DNA-Qualität zugrunde liegen konnte. Um Hybridisierungsfehler im Datensatz zu minimieren, wurde bei vorliegender Heterozygotenfrequenz  $<26\%$  die Probe nicht miteinbezogen. Es wurde eine Populationsstratifikation mittels multidimensionaler Skalierung (MDS) berechnet, um durch verschiedene ethnische Bevölkerungsschichten oder Genotypisierungsfehler falsch-positive Ergebnisse zu minimieren. Bei einem Kinship-Koeffizienten  $>0.0625$ , entsprechend einem Verwandtschaftsgrad Cousin ersten Grades, wurden Proben ausgeschlossen um eventuell unbekannte Verwandtschaften nicht einzubeziehen (Quinlan, 2018). SNPs wurden ausgeschlossen, deren Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE)  $<10^{-4}$ , deren Frequenz fehlender Werte pro SNP bei  $>2\%$  und außerdem solche, deren Minor Allel Frequenz  $<1\%$  lag.

Für die weiteren Analysen wurden Basenpaarpositionen und Strangorientierungen mit dem HapMap Datensatz (HapMap human build 37 [hg19]) abgeglichen.

Von insgesamt 1272 Chip-genotypisierten Frühgeborenen konnten so 1257 Proben analysiert werden.

Die Berechnungen wurden mit dem Programm PLINK® Version 1.07 (Purcell et al., 2007), R® Version 2.15.0 (R Core Project, 2013) und R Paket SNPRelate® (Zheng et al., 2012) durchgeführt (Hessler, 2013).

### 2.5.1.2 Imputation

Durch Berechnungen des LDs und Haplotyps der genotypisierten SNPs konnten zusätzlich Genotypen mit europäischen (CEU) Referenzdaten des HapMap-Projektes (The International HapMap Consortium 2007) und des 1000 Genome Projektes (The 1000 Genome Project Consortium 2012) durch den Markov Ketten Monte Carlo Modell nutzenden Algorithmus verfügbar gemacht werden. Betrug die Imputationswahrscheinlichkeit eines SNPs weniger als 99% wurde dieser nicht in weitere Analysen einbezogen. Es wurde das Programm IMPUTE® Version 2 (Howie et al., 2009) und GTOOL® Version 0.7.5 (Freeman, 2017) zur Berechnung verwendet.

## 2 Material und Methoden

### 2.5.1.3 Analyse der erweiterten GWAS

Das Atemnotsyndrom VLBW Frühgeborener wurde in der GWA Studie abschließend mit jedem einzelnen SNP auf Assoziation überprüft. Die Berechnungen erfolgten ausgehend vom Minor-Allel.

Als Parameter für das sichere Vorliegen eines Atemnotsyndroms fiel die Entscheidung auf die exogene Surfactantapplikation („Exogene Surfactantapplikation ist erfolgt: JA/NEIN“).

Die Genotyp-Phänotyp Assoziationsberechnung erfolgte mittels logistischer Regression im additiven genetischen Modell. Dieses Modell beschreibt, dass das Risiko zu erkranken durch die Anzahl der kodierenden Allele linear additiv ansteigt. Das Gestationsalter, wichtigster Risikofaktor für das Auftreten eines Atemnotsyndroms, wurde dabei als abhängige Kovariable berücksichtigt.

Wird der p-Wert ermittelt, kann bei einem einzelnen SNP entweder die Nullhypothese (keine genetische Assoziation zum ANS des VLBW Frühgeborenen) oder Alternativhypothese (bestehende signifikante Assoziation) angenommen werden. Durch Berechnung des genomweiten Signifikanzniveaus wird ein Fehler 1. Art ( $\alpha$ -Fehler), ein fälschlicherweise Annehmen der Alternativhypothese, ausgeschlossen. Ein Fehler 2. Art ( $\beta$ -Fehler), ein irrtümliches Annehmen der Nullhypothese, kann durch die ausreichende Power ( $=1 - \beta$ ) der Studie ausgeschlossen werden. Die Power gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Unterschied nachgewiesen werden kann. Determiniert ist die Power-Berechnung von Fallzahl, Effektstärke, Varianz und Signifikanzniveau. Als Ideal gilt eine Power von mindestens 80% (Schulz und Grimes, 2006) (Heßler, 2013) (Esselborn, 2015).

Die Ergebnisse werden graphisch im sogenannten Manhattan-Plot dargestellt (s. Abb. 3). Die Grenze zur Signifikanz ist bei GWA-Studien in der Literatur niedriger gesetzt aufgrund der Abhängigkeit von SNPs zu LDs, die genomweite Signifikanz der GWA besteht bei p-Werten unter  $5 \times 10^{-8}$  (de Bakker et al., 2008). Zehn „Top-Hits“ der GWAS wurden anschließend in einer zweiten unabhängigen Frühgeborenenkohorte repliziert, um die Ergebnisse zu validieren (s. Kap. 3.3). Als globale nominelle Signifikanz (p-Wert) der Replikation wurde ein p-Wert  $< 5 \times 10^{-3}$  ( $p=0,005$ ) als Schwellenwert angenommen. Diese ergibt sich gemäß der Bonferroni-Korrektur aus der globalen Signifikanz 0,05 geteilt durch die Anzahl der Tests (d.h.  $0,05/10 = 0,005$ ).

Für die Angabe des Maßes des Effektes einer genetischen Assoziation wurde das Odds Ratio (OR) mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall (KI) bestimmt. Bei OR-

## 2 Material und Methoden

Werten  $<1$  besteht ein Schutz-, bei Werten  $>1$  ein Risikoallel, bei 1 liegt kein assoziierter Effekt vor.

Die Analyse der statistischen Daten der Assoziationsanalyse wurde mit dem Programm SNPTEST® Version 2.5 (Marchini und Howie, 2010) durchgeführt.

### 2.5.2 Allgemeine statistische Analysen

Für die statistische Untersuchung der klinischen Daten wurde das SPSS Programm® (IBM Corp., 2017) genutzt. Es wurden Mittelwert und Standardabweichung bestimmt. Nichtparametrisch wurde zur Überprüfung der Signifikanz zwischen der Rangfolge zweier Klassen der Mann-Whitney-U-Test eingesetzt, zum Vergleich der Unabhängigkeit von Häufigkeiten der exakte Test nach Fisher oder der Chi-Quadrat-Test nach Pearson.

Bei einem p-Wert  $<0,05$  wurde ein Ergebnis als statistisch signifikant bewertet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Demographische und Klinische Charakteristika der Studienteilnehmer

In die genetische Untersuchung zum Atemnotsyndrom VLBW Frühgeborener wurden insgesamt 7.481 VLBW Frühgeborene, die von Dezember 2009 bis September 2015 in 57 neonatologischen Kliniken in Deutschland geboren wurden, integriert. Proben von 1257 Frühgeborenen wurden in die GWAS und 2112 in die Replikation eingeschlossen. Für die zweite Replikation wurden 4112 Frühgeborene rekrutiert. Tabelle 6 zeigt einen Überblick über klinische Charakteristika und Demographie der Patienten.

**Tabelle 6:** Charakteristika der VLBW Frühgeborenenkohorte

	GWAS n=1257	Replikation 1 n=2112	Replikation 2 n=4112
Gestationsalter (Wochen)*	28,7 (2,7)	28,7 (2,6)	28,7 (2,8)
Geburtsgewicht (Gramm)*	1056 (302)	1063 (293)	1058 (308)
Mehrlinge (%)	25,1	37,6	33,4
Mädchen (%)	48,4	48,9	49,2
Surfactanttherapie (%)	58,8	51,8	56,4
Deutsch vs. Europa/Asien/Afrika (%)	100	61	73

\* (Standardabweichung)

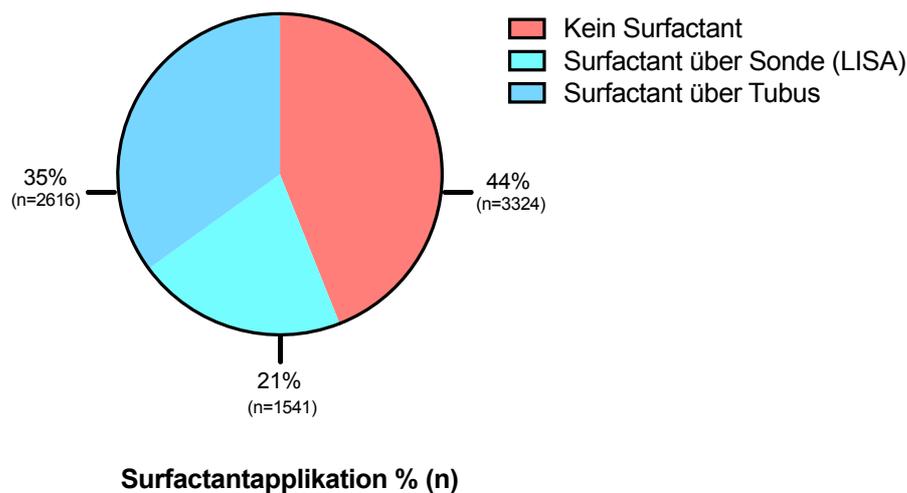
### 3 Ergebnisse

Das durchschnittliche Gestationsalter der VLBW Frühgeborenenkohorte liegt bei 29 Wochen. Die Frühgeborenen wurden etwa zu gleichen prozentualen Anteilen mit Surfactant therapiert (GWA 58,8%, Replikation 51,8% bzw. 56,4%). Der Anteil männlicher Frühgeborener entspricht dem Anteil weiblicher Frühgeborener. Bei der Genomweiten Assoziationsanalyse wurde aufgrund der genetischen Determination per Zufallsprinzip nur ein Geschwisterkind von Mehrlingen in die Untersuchung einbezogen und es wurden nur Frühgeborene ausgewählt, deren Mütter als Herkunftsland Deutschland angegeben hatten. In der ersten und zweiten Replikation wurden alle Frühgeborenen untersucht, die die Einschlusskriterien erfüllten und deren DNA vorlag. Aufgrund dieser Methodik wurden in die Replikation alle Mehrlinge eingebracht und auch Frühgeborene genotypisiert, deren Mütter eine andere Herkunft als Deutschland angegeben hatten. Die Herkunft der Mutter in der Replikationskohorte war zu 74,1% aus Deutschland, 10,4% der Mütter kamen aus dem übrigen Europa und Russland, 10,0% aus dem Nahen Osten einschließlich der Türkei, 1,5% aus Asien, 2,8% aus Afrika und 1,2% waren sonstiger Herkunft. Nach der Genotypisierung der Replikationskohorte wurden Mütter anderer Herkunft als Deutschland ausgeschlossen, um Populationsfehler zu vermeiden. Mehrlinge wurden nach der Genotypisierung einfach (per Zufall) herausgerechnet. Insgesamt entsprechen die Probanden einer einheitlich verteilten Kohorte von VLBW Frühgeborenen.

#### 3.1.1 Surfactantapplikation

Folgende Abbildung zeigt die verschiedenen Formen der Surfactantapplikation der in die Untersuchung einbezogenen VLBW Frühgeborenen (n=7481). Über die Hälfte (56%) wurde mit Surfactant behandelt. Der größere Teil erhielt die Surfactantgabe über den Tubus (35%, n=2616), ein kleinerer Teil erhielt Surfactant über eine Sonde (21%, n=1541). 44% der VLBW Frühgeborenen wurde nicht mit Surfactant behandelt (n=3324).

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 2:** Surfactantapplikation der VLBW Frühgeborenenkohorte

44% der Frühgeborenen erhielten kein Surfactant, 35% wurden mit der klassischen Methode Surfactant über den Tubus und 21% mit Surfactantgabe ohne Intubation behandelt.

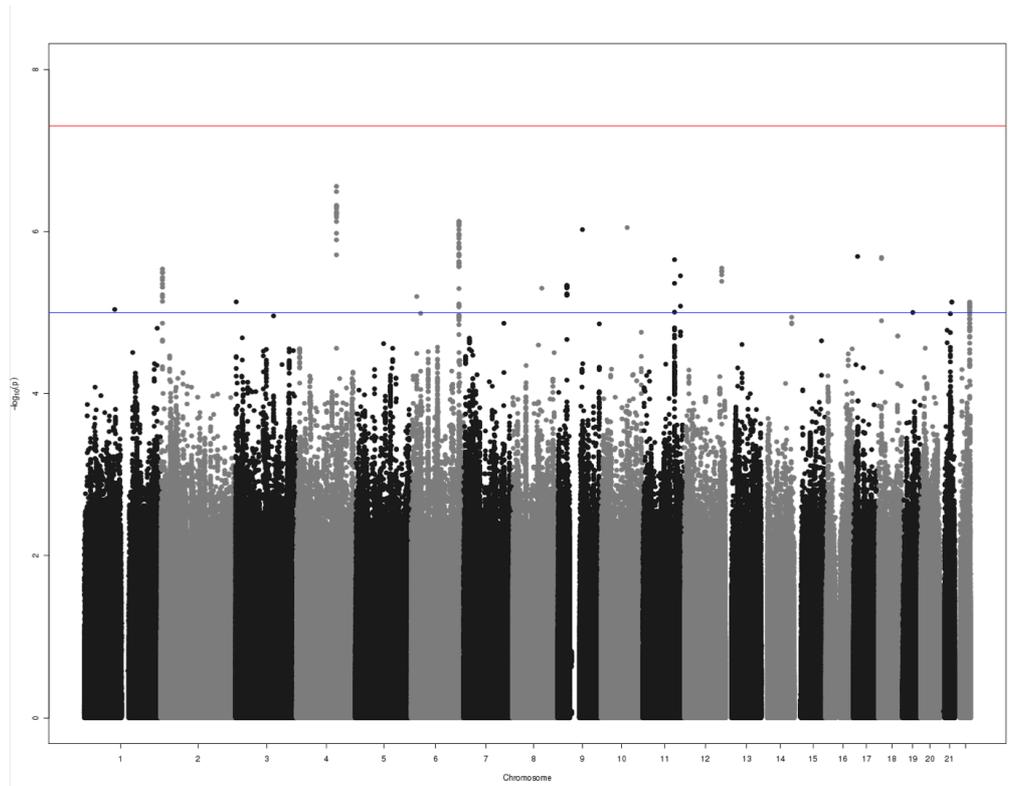
### 3.2 Ergebnis der Genomweiten Assoziationsstudie

Für die Genomweite Assoziationsstudie wurden 1272 VLBW Frühgeborene (geboren 2009-2010) chip-genotypisiert. Es erfüllten 1257 Frühgeborene die Qualitätskontrollen.

Das Ergebnis der GWAS zum Atemnotsyndrom VLBW Frühgeborener ist graphisch dem Manhattan Plot (s. Abb. 3) zu entnehmen. Der Manhattan Plot stellt die Signifikanz der genetischen Assoziation eines SNPs zur Surfactanttherapie VLBW Frühgeborener dar. Die genetischen Regionen, in denen Frühgeborene mit Atemnotsyndrom (Fall) und Frühgeborene ohne ANS (Kontrolle) eine signifikant unterschiedliche Frequenz aufweisen, sind verdächtig für eine Assoziation mit einem Krankheitsrisiko. Kein SNP liegt im Bereich genomweiter Signifikanz von  $5 \times 10^{-8}$  (de Bakker et al., 2008). Einige SNPs sind jedoch in genomweit verdächtigen Bereichen mit p-Werten von unter  $5 \times 10^{-5}$  (Manolio et al., 2009) lokalisiert. Diese genomweit verdächtigen Bereiche wurden für die Replikation in weitere Analysen einbezogen (Pooling); es erreichten insgesamt 10 SNPs auf 7 unterschiedlichen Chromosomen diese

### 3 Ergebnisse

Signifikanz (s. Abb. 3, Tab. 7 und Tab. 9). Die Power betrug jeweils >90%. Die SNPs liegen in Intron Bereichen. Die besprochenen Regionen lassen sich keiner direkten Ätiologie des Atemnotsyndroms zuordnen.



**Abbildung 3:** Manhattan Plot zur Surfactanttherapie VLBW Frühgeborener

Stärke der genetischen Assoziation der exogenen Surfactantapplikation VLBW Frühgeborener aufgetragen gegen ihre chromosomale Position. Von jedem Frühgeborenen wird der  $-\log_{10}$  p-Wert des SNPs (y-Achse) gegen seine chromosomale Basenpaarposition (x-Achse) aufgetragen. Ein einzelner Punkt steht für einen SNP, der mit dem AXIOM<sup>TM</sup> Genome-wide CEU 1 Array Plate 2.0. genotypisiert oder imputiert wurde. Die flachen, langen Bereiche repräsentieren die Werte zwischen  $10^{-1}$  und  $10^{-4}$  (sog. engl.: *skyscraper*), für weitere Analysen interessant sind die Bereiche der Signifikanzniveaus darunter, hier zwischen  $5 \times 10^{-5}$  (blaue Linie) und  $5 \times 10^{-8}$  (rote Linie) (sog. engl.: *antennas*) (Ziegler und Koenig, 2010). Kein Locus erreicht das Niveau genomweiter Signifikanz.

### 3 Ergebnisse

**Tabelle 7.1:** Ergebnisse der Genomweiten Assoziationsanalyse

	rs13134269	rs1385731	rs17013394	rs4878404
Chromosom	4	6	4	9
Basenpaarposition*	129412788	155480440	129450392	29589489
Genotypen (Major(A)-/Minor(B) Allel)	T/C	A/G	C/T	C/A
Fall AA (absolut)	385	205	386	575
Fall AB (absolut)	319	370	317	152
Fall BB (absolut)	32	162	34	10
Kontrolle AA (absolut)	342	102	342	348
Kontrolle AB (absolut)	161	266	159	156
Kontrolle BB (absolut)	17	152	19	16
MAF** Fall	0,26	0,53	0,26	0,12
MAF** Kontrolle	0,19	0,45	0,19	0,18
HWE*** Kontrollen	0,89	0,48	0,89	0,77
OR**** (95% KI)	1,5 (1,3-1,8)	0,7 (0,6-0,9)	1,5 (1,2-1,8)	0,6 (0,5-0,7)
p-Wert	$3,2 \times 10^{-7}$	$2,0 \times 10^{-6}$	$5,1 \times 10^{-7}$	$5,0 \times 10^{-6}$

\* nach Genome Reference Consortium Human Build 37 (GRCh37) \*\*MAF = Minor Allel Frequenz \*\*\*HWE = Hardy-Weinberg Equilibrium \*\*\*\*OR = Odds Ratio

**Tabelle 7.2:** Ergebnisse der Genomweiten Assoziationsanalyse

	rs629367	rs745929	rs7593216	rs76084898
Chromosom	11	9	2	18
Basenpaarposition*	122017014	80078027	5294800	10039710
Genotypen (Major(A)-/Minor(B) Allel)	C/A	C/G	C/T	G/T

### 3 Ergebnisse

**Tabelle 7.2:** Ergebnisse der Genomweiten Assoziationsanalyse: Fortsetzung

	rs629367	rs745929	rs7593216	rs76084898
Fall AA (absolut)	17	91	511	717
Fall AB (absolut)	179	336	205	20
Fall BB (absolut)	541	310	21	0
Kontrolle AA (absolut)	4	96	416	482
Kontrolle AB (absolut)	90	257	97	37
Kontrolle BB (absolut)	426	167	7	1
MAF** Fall	0,14	0,35	0,17	0,01
MAF** Kontrolle	0,09	0,43	0,11	0,04
HWE*** Kontrollen	1	0,92	0,64	0,5
OR**** (95% KI)	0,6 (0,5-0,8)	1,4 (1,2-1,6)	1,7 (1,3-2,1)	0,4 (0,2-0,6)
p-Wert	$3,5 \times 10^{-6}$	$9,4 \times 10^{-7}$	$3,2 \times 10^{-6}$	$2,1 \times 10^{-6}$

\* nach Genome Reference Consortium Human Build 37 (GRCh37) \*\*MAF = Minor Allel Frequenz \*\*\*HWE = Hardy-Weinberg Equilibrium \*\*\*\*OR = Odds Ratio

**Tabelle 7.3:** Ergebnisse der Genomweiten Assoziationsanalyse

	rs77219825	rs923143
Chromosom	17	6
Basenpaarposition*	13517097	155470190
Genotypen (Major(A)-/Minor(B) Allel)	A/T	C/G
Fall AA (absolut)	17	211
Fall AB (absolut)	179	364
Fall BB (absolut)	541	162
Kontrolle AA (absolut)	4	102

### 3 Ergebnisse

**Tabelle 7.3:** Ergebnisse der Genomweiten Assoziationsanalyse: Fortsetzung

	rs77219825	rs923143
Kontrolle AB (absolut)	90	269
Kontrolle BB (absolut)	426	149
MAF** Fall	0,14	0,47
MAF** Kontrolle	0,09	0,55
HWE*** Kontrollen	1	0,38
OR**** (95% KI)	2,6 (1,6-4,1)	0,7 (0,6-0,9)
p-Wert	$2,0 \times 10^{-6}$	$7,5 \times 10^{-7}$

\* nach Genome Reference Consortium Human Build 37 (GRCh37) \*\*MAF = Minor Allel Frequenz \*\*\*HWE = Hardy-Weinberg Equilibrium \*\*\*\*OR = Odds Ratio

### 3.3 Ergebnis der Replikation und Validierung der Variante rs4878404

Zur Validierung der Resultate der GWAS wurde eine Replikationsanalyse durchgeführt. 10 basierend auf den p-Wert Ergebnissen der GWAS ausgewählte „Top-Hit“ SNPs wurden in einer unabhängigen Gruppe von insgesamt 2112 VLBW Frühgeborenen genotypisiert. Für die Replikation wurde eine Signifikanz von  $5 \times 10^{-3}$  ( $p=0,005$ ) als Schwellenwert für eine Assoziation angenommen. Die Replikation konnte bei >90% der SNPs erfolgreich durchgeführt werden. Tabelle 9 fasst die Ergebnisse der GWAS und Replikation zusammen.

Unter Korrektur nach Gestationsalter und unter Annahme des additiven Vererbungsmodells erreichte in der logistischen Regression nur der SNP *rs4878404* eine signifikante Assoziation in der Replikation ( $p=0,004$ ) ( $n=2112$ ) (s. Tab. 9).

Um diese Assoziation in einer noch größeren Gruppe zu analysieren und die Power zu erhöhen wurde erneut bei  $n=4112$  VLBW Frühgeborenen der SNP *rs4878404* genotypisiert. Auch in dieser zweiten Replikation bestätigte sich die

### 3 Ergebnisse

Assoziation zwischen *rs4878404* und der Surfactanttherapie ( $p=0,002$ ; OR 0.79, 95% Konfidenzintervall (KI) 0.68-0.92; logistische Regression korrigiert nach Gestationsalter).

Insgesamt umfasst die zusammengeführte Kohorte in einer kombinierten Analyse für diesen SNP  $n=7481$  VLBW Frühgeborene. Die Replikation und GWAS von *rs4878404* ergab eine signifikante Assoziation zur exogenen Surfactanttherapie VLBW Frühgeborener (Odds Ratio (OR): 0.72; 95% Konfidenzintervall (KI) 0.65-0.81;  $p=6,8 \times 10^{-9}$ ). Schließt man nicht-deutsche Kinder aus und analysiert man jeweils nur ein Frühgeborenes pro Mehrlingsgruppe, so ist die Assoziation nicht mehr genomweit signifikant ( $n=4874$ , Odds Ratio (OR): 0.74; 95% Konfidenzintervall (KI) 0.65-0.86;  $p=3,3 \times 10^{-5}$ ) (s. Tab. 8).

**Tabelle 8:** Ergebnis der Replikation und GWAS von *rs4878404*

	<i>rs4878404</i> (Gesamt=7481)	<i>rs4878404</i> (Gesamt=4874)
Fall CC (absolut)	3132	2084
Fall CA (absolut)	942	569
Fall AA (absolut)	80	49
Kontrolle CC (absolut)	2378	1591
Kontrolle CA (absolut)	845	532
Kontrolle AA (absolut)	104	49
MAF* Fall	0,13	0,12
MAF* Kontrolle	0,16	0,15
OR** (95% KI)	0,72 (0.65-0.81)	0,74 (0.65-0.86)
p-Wert	$6,8 \times 10^{-9}$	$3,3 \times 10^{-5}$

\*MAF = Minor Allel Frequenz \*\*OR = Odds Ratio

**Tabelle 9:** Ergebnisse der Genomweiten Assoziationsanalyse und Replikation

Chr.	rs- Nummer	Major-/Minor Allel	GWA (n=1257) p-Wert	GWA OR (95% KI)	Replikation (n=2112) p-Wert	Replikation OR (95% KI)
4	rs13134269	T/C	3,2x10 <sup>-7</sup>	1,5 (1,3-1,8)	7,8 x10 <sup>-1</sup>	1,0 (0,8-1,6)
6	rs1385731	A/G	2,0x10 <sup>-6</sup>	0,7 (0,6-0,9)	1,9 x10 <sup>-1</sup>	0,9 (0,8-1,0)
4	rs17013394	C/T	5,1x10 <sup>-7</sup>	1,5 (1,2-1,8)	6,6 x10 <sup>-1</sup>	1,0 (0,8-1,1)
9	rs4878404	C/A	5,0x10 <sup>-6</sup>	0,6 (0,5-0,7)	3,6 x10 <sup>-3</sup>	0,8 (0,6-0,9)
11	rs629367	C/A	3,5x10 <sup>-6</sup>	0,6 (0,5-0,8)	6,8 x10 <sup>-1</sup>	1,0 (0,8-1,3)
9	rs745929	C/G	9,4x10 <sup>-7</sup>	1,4 (1,2-1,6)	7,4 x10 <sup>-1</sup>	0,9 (0,9-1,2)
2	rs7593216	C/T	3,2x10 <sup>-6</sup>	1,7 (1,3-2,1)	9,6 x10 <sup>-1</sup>	1,0 (0,8-1,2)
18	rs76084898	G/T	2,1x10 <sup>-6</sup>	0,4 (0,2-0,6)	6,2 x10 <sup>-1</sup>	0,9 (0,6-1,4)
17	rs77219825	A/T	2,0x10 <sup>-6</sup>	2,6 (1,6-4,1)	3,6 x10 <sup>-1</sup>	0,8 (0,6-1,2)
6	rs923143	C/G	7,5x10 <sup>-7</sup>	0,7 (0,6-0,9)	1,9 x10 <sup>-1</sup>	0,9 (0,8-1,0)

GWA-Population (n=1257 Frühgeborene) genotypisiert mit AXIOM™ Genome-wide CEU 1 Array Plate 2.0.  
 Replikationskohorte (n=2112 Frühgeborene), mittels TaqMan® SNP Genotyping Assay bestimmt. Chr.: Chromosom  
 OR: Odds Ratio KI: Konfidenzintervall

### 3 Ergebnisse

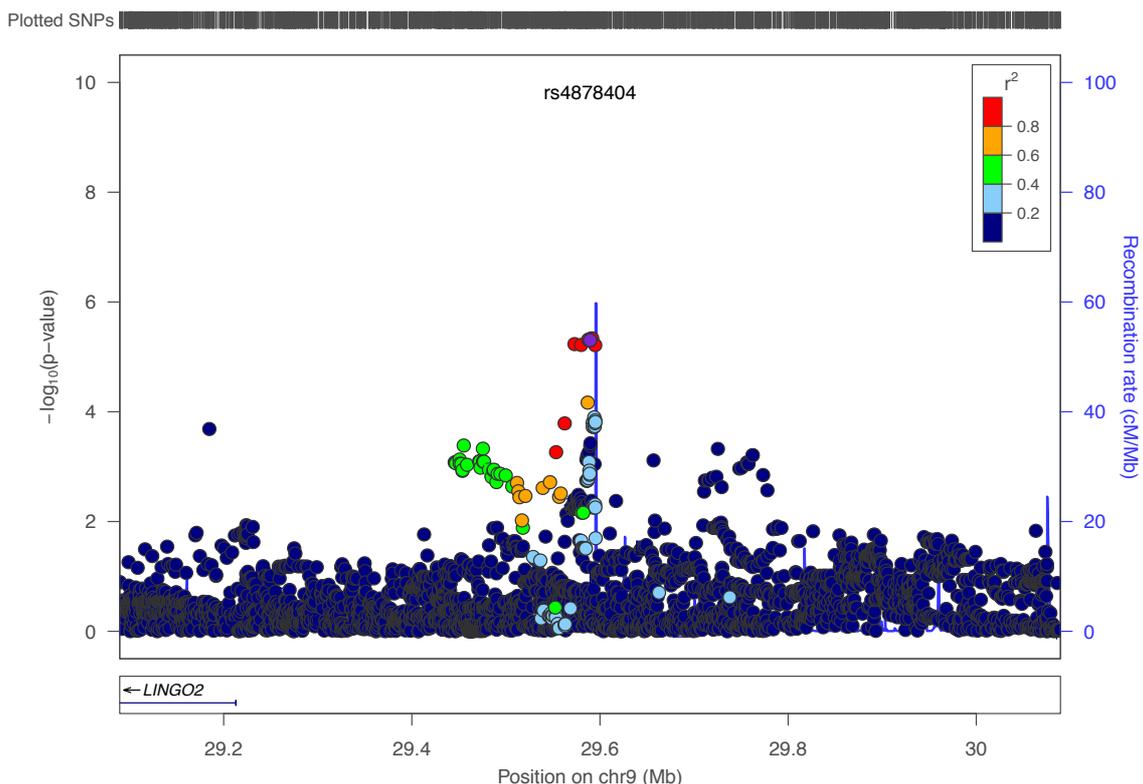
#### 3.4 Charakteristika der Variante rs4878404 und das LINGO2 Gen

##### 3.4.1 Genetische Lokalisation und das LINGO2 Gen

Der SNP *rs4878404* hat in der europäischen Bevölkerung eine Minor Allel Frequenz von 13% und liegt auf Chromosom 9 (Abb. 4). In Europa tragen 20% das Allel heterozygot und 2% homozygot.

Für den Polymorphismus ist in den gängigen Datenbanken UCSC ([www.genome.ucsc.edu](http://www.genome.ucsc.edu)) und NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) zum derzeitigen Stand kein kodierendes Gen bekannt. Auch für regulierende Einflüsse ([www.regulomedb.org](http://www.regulomedb.org)) sind keine Assoziationen publiziert.

Im Assoziationsbereich liegt mehrere Kilobasenpaare entfernt (weniger als 10kb, etwa 400kpb) das erste kodierende Gen, Lingo 2.



**Abbildung 4:** Locus Zoom Plot von rs4878404 (Chromosom 9) für die Assoziation „Surfactanttherapie – JA/NEIN“

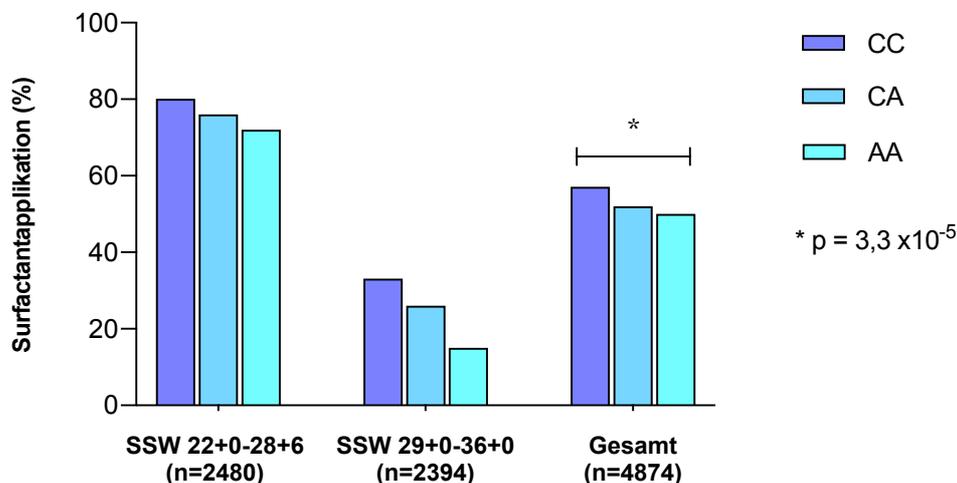
Der Bereich von 29,2 bis 30 Mb auf Grundlage der HapMap Phase II (CEU, YRI and JPT+CHB) und 1000 Genome (CEU) Project Daten. Exogene Surfactantapplikation bei VLBW Frühgeborenen aufgetragen gegen die chromosomale Position in Megabasenpaaren.

### 3 Ergebnisse

Es wurden weitere SNPs innerhalb der genetischen Region von LINGO2 (Intron oder Exon) getestet, *rs10491678*, *rs10968574*, *rs683471* und *rs10813121*. Nur *rs10968574* zeigte statistisch signifikante Ergebnisse für Surfactantapplikation und tracheale Beatmung, jedoch war die Risikoallelgruppe sehr klein (n=17). Sämtliche weitere Parameter für die SNPs hatten keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das Outcome Frühgeborener (siehe 7.3 im Anhang).

#### 3.4.2 Surfactantapplikation

Abbildung 5 und Tabelle 10 zeigen die Ergebnisse der GWAS und Replikation für die Surfactanttherapie VLBW Frühgeborener aufgetragen nach ihrem *rs4878404* Genotyp (n=4874). CA/AA- und AA- Allelträger VLBW Frühgeborene haben eine statistisch signifikante Assoziation zu einer reduzierten exogenen Surfactanttherapie (n=4874, Odds Ratio (OR): 0.74; 95% Konfidenzintervall (KI) 0.65-0.86;  $p=3,3 \times 10^{-5}$ ). Tabelle 10 zeigt, dass eine statistische Signifikanz der Variante *rs4878404* für ein Gestationsalter > 28. SSW ( $p=0,001$ ) zur Surfactantapplikation besteht. In der Gruppe der VLBW Frühgeborenen der 23.-28. SSW ist der Ergebnis nicht statistisch signifikant.



**Abbildung 5:** Ergebnis der Replikation und GWAS VLBW Frühgeborener (n=4874) der Variante *rs4878404* zur Fragestellung „Surfactanttherapie JA/NEIN“

Prozentuale Verteilung der exogenen Surfactantapplikation (%) der VLBW Frühgeborenen aufgetragen gegen ihr Gestationsalter und ihre allelische Diskrimination. Der CA/AA Genotyp zeigt eine reduzierte exogene Surfactantapplikationsrate.

### 3 Ergebnisse

**Tabelle 10:** Externe Surfactantapplikationsrate (absolut und prozentual) der VLBW Frühgeborenen (n=4874) der Variante rs4878404 abhängig vom Gestationsalter

SSW	CC (n=3675)	CA (n=1101)	AA (n=98)	p-Wert
22+0-28+6	1491 (80,1%)	429 (76,6%)	43 (72,9%)	0,12
29+0-36+0	593 (32,7%)	140 (25,8%)	6 (15,4%)	0,001
Gesamt	2084 (56,7%)	569 (51,7%)	49 (50,0%)	p=3,3 x10 <sup>-5</sup>

In Tabelle 11 ist ein multivariates Modell dargestellt. Bekannte Einflussfaktoren auf das Entstehungsmodell des Atemnotsyndroms wurden neben dem Gestationsalter berücksichtigt (Geschlecht, Ethnie, Mehrling, Lungenreife, Amnioninfektionssyndrom, HELLP und IUGR).

Die Analyse zeigt, dass der SNP unabhängig von den bekannten Risikofaktoren mit dem ANS Frühgeborener assoziiert ist (p=4,2x10<sup>-5</sup>; OR 0.86 95% Konfidenzintervall (KI) 0.77-0.97; multivariate logistische Regression n=4874). Das Ergebnis kann unabhängig von Mehrlingen und Herkunft (Ethnie) auch in der größeren Gruppe von Frühgeborenen bestätigt werden (p=2,19x10<sup>-7</sup>; OR 0.75 95% Konfidenzintervall (KI) 0.67-0.83; multivariate logistische Regression n=7395).

**Tabelle 11:** Multivariate logistische Regression adjustiert zu Faktoren, die das Atemnotsyndrom beeinflussen und Variante rs4878404 (n=4874)

Variable	p-Wert	Odds Ratio (95% KI)
Gestationsalter	3,1 x10 <sup>-221</sup>	0,56 (0,54-0,58)
Geschlecht	2,5 x10 <sup>-3</sup>	0,78 (0,69-0,86)
Mehrling	3,9 x10 <sup>-1</sup>	1,18 (1,05-1,33)
Lungenreife	8,2 x10 <sup>-3</sup>	0,77 (0,64-0,93)
Amnioninfektionssyndrom	2,6 x10 <sup>-5</sup>	0,68 (0,59-0,78)
HELLP	0,55	1,21 (0,99-1,49)
IUGR (<P10)	0,31	0,94 (0,79-1,10)
rs4878404	4,2x x10 <sup>-5</sup>	0,86 (0,77-0,97)

### 3 Ergebnisse

#### 3.4.3 Ethnie

In Tabelle 12 sind *rs4878404* Allelträger und ihre Ethnie dargestellt. Der CA/AA- und AA- Genotyp tritt häufiger in der asiatischen und afrikanischen Bevölkerung auf. Es sind etwa 20% heterozygote Allelträger im europäischen Raum und jeweils 40% in Afrika sowie Asien vertreten.

**Tabelle 12:** Die Variante *rs4878404* und Ethnie

Herkunft [%] (n)	CC	CA	AA
Deutschland	75 (4169)	23 (1271)	2 (105)
Übriges Europa und Russland	75 (585)	22 (171)	3 (21)
Naher Osten einschließlich der Türkei	71 (532)	25 (189)	4 (30)
Asien	48 (54)	43 (49)	9 (10)
Afrika	53 (109)	40 (83)	7 (15)
Sonstige	69 (61)	27 (24)	3 (3)

#### 3.4.4 Perinatale Umstände, Kardiorespiratorische Anpassung und Verlauf

Es bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede der prä- und perinatalen klinischen Charakteristika der *rs4878404* genotypisierten Frühgeborenen. Weder Geburtsmodus, -ursache, -gewicht oder Gestationsalter, noch die Rate an Blasensprung, Lungenreife vor Geburt, Tokolyse, Entbindungsmodus oder APGAR und Nabelschnur pH sind zwischen den verschiedenen Allelträgern statistisch signifikant verschieden. Die Daten sind im Anhang zu finden (s. 7.2).

Eine Übersicht über die kurz- und langfristigen kardiorespiratorischen postnatalen Charakteristika der VLBW Frühgeborenen abhängig von ihrem Genotyp gibt Tabelle 13. Das applizierte Surfactant ist ohne statistisch signifikante Differenz in der Anzahl der Gaben für verschiedene *rs4878404* Allelträgergruppen. Es bestehen kaum Unterschiede für den Sauerstoffbedarf innerhalb der ersten 12 Stunden und für das Ende des Sauerstoffbedarfs. Der CA/AA-Genotyp hat eine niedrigere, jedoch nicht

### 3 Ergebnisse

statistisch signifikante, tracheale Beatmungsrate (vor allem der homozygoten Allelträger), geringere Rate an Diuretika- und Steroid-/ Dexamethasontherapien sowie niedrigere Inhalationsrate. Der CA/AA Genotyp wird deutlich weniger mit Analgetika behandelt ( $p=0,02$ ). In der homozygoten Allelträgergruppe ist bemerkenswert, dass kein RDS-Todesfall beobachtet wurde.

**Tabelle 13:** Kardiorespiratorische Charakteristika rs4878404 für VLBW Frühgeborene

	CC (n=3675)	CA (n=1101)	AA (n=98)	p-Wert
O2-Bedarf minimal innerhalb 12h [%]	23	23	22	n. sign.
O2 Bedarf maximal innerhalb 12h [%]	39	37	36	n.sign.
Anzahl Surfactantgaben*	0,91/1,16	0,85/1,14	0,86/1,22	n.sign.
LISA Verfahren [%]	20,2	19,5	17,3	0,70
Antibiotika [%]	85,2	85,3	84,7	0,99
Katecholamine [%]	18,9	20,5	15,5	0,33
Analgetika [%]	39,9	35,4	34,4	0,02
Diuretika [%]	33,3	32,3	26,8	0,36
Dexamethason [%]	5,5	4,4	4,8	0,42
tracheale Beatmung [%]	49,3	47,1	41,8	0,18
Pneumothorax [%]	5,6	4,8	4,1	0,51
Ende O2-Bedarf* [Tage]	31,2	29,7	35,0	n.sign.
Indomethacin/Ibuprofen [%]	27,9	27,8	27,9	1,0
Inhalationen [%]	18,3	16,4	16,4	0,09
Atemanaleptika [%]	88	89	92	0,38
Doxapram [%]	12,0	13,1	12,2	0,64
Steroide [%]	13,4	11,5	11,5	0,67

\* Mittelwert / Standardabweichung, Mann-Whitney-U Test für Beatmungstage und Anzahl Surfactantgaben; Fisher's exact Test für weitere Daten. n.sign.: nicht signifikant

### 3 Ergebnisse

#### 3.4.5 Wichtigste Komorbiditäten, Mortalität und langfristige Entwicklung

Eine Übersicht der wichtigsten kurz- und langfristigen schweren klinischen Komplikationen von VLBW Frühgeborenen zeigt Tabelle 14. Die *rs4878404* Allelträger haben keine statistisch signifikanten Unterschiede der Komorbiditäten wie Hirnblutung, PVL, BPD, NEC und auffälligem Hörscreening. Die Mortalität ist bei *rs4878404* Frühgeborenen nicht statistisch signifikant verschieden.

**Tabelle 14:** Komorbiditäten *rs4878404* für VLBW Frühgeborene

[%]	CC (n= 3675)	CA (n=1101)	AA (n=98)	p-Wert
Hirnblutung	17,3	16,4	20,4	0,54
IVH Grad 1/2	11,2	10,2	10,2	0,71
IVH Grad 3/4	5,9	6,0	9,1	0,71
PVL	3,7	3,3	4,1	0,81
Hörscreening auffällig	10,8	11,5	10,6	0,81
BPD	16,1	13,4	17,3	0,09
Sepsis mit pos. Blutkultur	13,2	12,5	11,9	0,61
OP wegen NEC od. FIP	5,3	6,6	4,7	0,41
Tod	3,3	2,8	3,1	0,76
OP PDA	4,7	4,3	4,1	0,80

Das langfristige postnatale Outcome der Frühgeborenen wurde in einem Alter von 5-6 Jahren evaluiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 dargestellt. Die Daten ergeben im Wesentlichen keine Differenzen zwischen verschiedenen Allelträgern. Der CA/AA-Genotyp zeigt eine geringgradig niedrigere Rate an Cerebralparese und neurologisch leicht auffälligem Status, jedoch ohne statistische Signifikanz. Keine Unterschiede bestehen im pulmonalem Outcome (Lungenfunktion). Zu beachten ist die geringe Fallzahl.

### 3 Ergebnisse

**Tabelle 15:** Outcome rs4878404 VLBW Frühgeborene: Nachuntersuchung im Alter von 5-6 Jahren

[%] [(n)]	CC	CA	AA	p-Wert
Gesamt IQ*	97/15 (725)	98/15 (199)	96/12 (22)	0,59
Cerebralparese	4,8 (729)	5,2 (210)	0 (18)	0,61
<i>Neurologischer Status</i>				0,29
altersentsprechend	80,6 (465)	80,5 (136)	71,4 (10)	
leicht auffällig	11,3 (65)	12,4 (21)	28,6 (4)	
pathologisch	8,1 (47)	7,1 (12)	0 (0)	
<i>Lungenfunktion</i>				
FEV1%*	86,5/16,4 (644)	86,2/15,8 (179)	87,1/14,9 (20)	0,38
FEV1<80%	35,7 (230)	32,4 (58)	25 (5)	0,47

\* Mittelwert / Standardabweichung

## 4 Diskussion

Diese Arbeit untersucht häufige hereditäre genetische Einflussfaktoren des Atemnotsyndroms VLBW Frühgeborener. Beschrieben ist eine hohe Heritabilität des Atemnotsyndroms, bisher konnten jedoch nur Kandidatengenstudien mit seltenen genetischen Assoziationen veröffentlicht werden.

In dieser Arbeit wurde erstmals eine Genomweite Assoziationsstudie zum Atemnotsyndrom mit anschließender unabhängiger Replikation der Ergebnisse durchgeführt. Identifiziert werden konnte ein häufig in der Bevölkerung vorkommender SNP *rs4878404* mit Einfluss auf das Auftreten des Atemnotsyndroms des Frühgeborenen.

Im Folgenden werden die Methodik und Ergebnisse der genetischen Studie diskutiert sowie mögliche Perspektiven aufgezeigt.

### 4.1 Genomweite Assoziationsstudie und Methodik

Die Genomweite Assoziationsstudie (GWAS) untersucht häufige genetische Variationen des menschlichen Genoms (SNPs) und deren ätiologischen Zusammenhang mit einem Merkmal oder einer Erkrankung, hier dem Atemnotsyndrom VLBW Frühgeborener (National Institute of Health, 2017). Die Datenerhebung erfolgte im Rahmen einer Kohortenstudie, diese gehört zu den analytischen Beobachtungsstudien.

Für die Interpretation der Ergebnisse einer GWAS ist die kritische Betrachtung der Daten entscheidend. Bedeutsam für eine erfolgreiche GWAS ist eine ausreichende Probengröße, denn Assoziationsstudien haben generell das Ziel minimale Effekte aufzuzeigen (The Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007). Durch die Populationsgröße weist diese genetische Studie eine hohe Reproduzierbarkeit auf. Weiterhin ist neben ihrer Größe eine homogene Population durch klare Einschlusskriterien ein relevanter Aspekt für eine aussagekräftige GWA (siehe 3.1). Demographische „Confounder“ aufgrund von Populationsstratifikation sind eine der größten Einschränkungen der Validität Genomweiter Assoziationsstudien. Wenn Variationen der Allelfrequenzen zwischen Populationssubgruppen wie beispielsweise verschiedene Ethnien oder geographische Herkunft existieren und im Gegenzug ihr

## 4 Diskussion

Krankheitsrisiko verschieden ist, können GWAS falsch positive Genassoziationen zur Erkrankung identifizieren (Cardon et al., 2003) (Pearson und Manolio, 2008). Frühgeborene wurden aus der Analyse ausgeschlossen, deren Mütter eine andere Herkunft als Deutschland angegeben haben. Zwillinge wurden nur einzeln und per Zufallsauswahl einbezogen.

Ein weiterer wichtiger Faktor der GWAS ist die korrekte Klassifikation des Phänotyps. Die Einschätzung eines Atemnotsyndroms erfolgte ohne die Verwendung eines standardisierten Scores (beispielsweise Silverman Score (Silverman und Andersen, 1956)), sondern anhand der Notwendigkeit der Surfactantapplikation. Bedingungen und Indikation der Surfactantgabe, die verschiedenen klinikinternen Standards der Neonatal Intensive Care Units (NICUs), beispielsweise zu dem neuen Surfactantapplikationsverfahren „Surfactantgabe ohne Intubation“, als auch subjektive Entscheidungen können dabei unterschiedliche Vorgehensweisen bedingen. Während beispielsweise einige Autoren die prophylaktische Surfactantapplikation unter der 26. Schwangerschaftswoche empfehlen (Finer, 2007) (Aly et al., 2005), was gegenwärtig eher nicht mehr empfohlen wird (Sardesai et al., 2017), ist in anderen Publikationen CPAP als Initialmaßnahme bis zu dem Erscheinen klinischer Zeichen eines ANS hinreichend (Morley et al., 2008). In der aktuellen Europäischen Konsensus Leitlinie zum Atemnotsyndrom kommen die Autoren zu dem Schluss, dass die Definition des ANS schwierig ist, wenn prophylaktisches Surfactant und sehr früher CPAP eingesetzt werden (Sweet et al., 2019). Des Weiteren haben ELBW der 23.-25. Gestationswoche aufgrund ihrer extremen Vulnerabilität fast alle ein ANS. Expertise, manuelle Geschicklichkeit und lokale Standards beeinflussen deshalb die Indikation zur Surfactantgabe und weitere Outcome-Parameter. Ein weiterer wichtiger Punkt einer erfolgreichen GWAS sind qualitativ richtige Genotypisierungsdaten. Sogenannte „Confounder“ sind Wechselwirkungen zwischen Fällen und Kontrollen, die andere Ursachen haben als die Erkrankung selbst. Ein Beispiel hierfür sind verschiedene Vorgehensweisen in der Methodik (unterschiedliche Labore und Experimentatoren). Außerdem können in großen Kohorten einer GWAS selbst kleine systematische Verschiedenheiten zu Fehlern führen. Die Proben wurden, um eine höchstmögliche Datenqualität zu erreichen, immer in demselben Labor und nach der genau festgelegten Methode isoliert und weiter analysiert.

Die letztliche Validierung der GWAS Ergebnisse erfolgt durch die Replikation. In der Replikation wurden neben unabhängigen Proben auch eine unabhängige Technologie benutzt, damit Laborfaktoren, die die ursprüngliche GWAS ggfs. beeinträchtigen

## 4 Diskussion

konnten, die Replikation nicht beeinträchtigen (Pearson und Manolio, 2008). Bekannte ätiologisch relevante „Confounder“ wurden in der Multivariaten Logistischen Regression berücksichtigt (s. Kap. 3.4). Die standardisierte klinische Datenerfassung erfolgte in Form von definierten Fragebögen mit Verwendung von allgemein bekannten kategorischen Systemen (zum Beispiel NEO-KISS, CRIB Score, mABC) und verfügt deshalb über eine große Reproduzierbarkeit. Untersuchungsbedingungen in der 5-Jahres-Nachuntersuchung waren möglichst gleich, wodurch eine hohe Wiederholbarkeit der Ergebnisse gewährleistet wird. Die Analyse der langfristigen Outcome Daten im Rahmen der 5-Jahres-Untersuchung umfasst bisher jedoch nur eine kleine Patientenzahl.

### 4.2 Der SNP rs4878404 und das LINGO2 Gen

Der mit dem ANS assoziierte SNP *rs4878404* erreichte eine Odds Ratio OR von 0,7 (95% Konfidenzintervall (KI) 0.65-0.86;  $p=3,3 \times 10^{-5}$ ). Träger des A-Allels haben ein niedrigeres Risiko, ein ANS zu entwickeln.

Es sind etwa 20% heterozygote Allelträger im europäischen Raum und jeweils 40% in Afrika sowie Asien zu finden (siehe 3.4.3). Es ist bekannt, dass europäische Frühgeborene zu einem besonders hohen Prozentsatz ein Atemnotsyndrom entwickeln (Wallace et al., 2017). Die hohen Allelfrequenzen für das A-Allel von *rs4878404* bei asiatischen und afrikanischen Frühgeborenen könnten ein Hinweis darauf sein, dass das A-Allel (oder ein damit assoziierter funktionell relevanter Polymorphismus) eine Ursache für die geringere Häufigkeit des ANS in afrikanischen und asiatischen Ländern ist.

Im Assoziationsbereich ist mehrere Kilobasenpaare entfernt (weniger als 10kb, etwa 400kpb) das erste kodierende Gen, LINGO2, lokalisiert. Das Leucin-reiche und Immunglobulin enthaltene Gen wird in neuronalem Gewebe exprimiert. Varianten des LINGO2 Gens wurden mit essentiellen Tremor und Übergewichtigkeit assoziiert (Vilarino-Guell et al., 2010) (Speakman, 2013). Die Funktion von LINGO2 ist noch unklar, neuere Untersuchungsergebnisse zeigen eine Assoziation von Varianten des Gens zu der Reaktionsfähigkeit der Luftwege bei einer Untersuchung von COPD-Patienten (Hansel et al., 2015). Die Ergebnisse einer Kohortenstudie französisch-

#### 4 Diskussion

kanadischer Frauen postuliert einen Zusammenhang von LINGO2 und der Pathogenität von Asthma (Berube et al., 2015).

Unsere Analysen weiterer SNPs, die mit einer Assoziation zu LINGO2 publiziert wurden, ergaben jedoch keine wegweisenden Hinweise auf eine Assoziation zur Surfactanttherapie, außer bei einer sehr kleinen Gruppe Frühgeborener des SNPs *rs10968574*. Die Fallzahl der Frühgeborenen mit Risikoallel ist allerdings so klein (n=17), dass daraus keine valide Aussage abgeleitet werden kann (s. 7.3). Inwieweit LINGO2 funktionellen Einfluss hat, ist bisher nicht bekannt. Der Zusammenhang, den die Studien zu Atemwegserkrankungen wie COPD und Asthma bronchiale zu dem Gen LINGO2 stellen, eröffnet jedoch möglicherweise neue Möglichkeiten für ein funktionelles Verständnis sowie der Erforschung neuer Therapieansätze. Möglich ist, dass der SNP *rs4878404* auf LINGO2 oder andere Genprodukte eine regulatorische Funktion ausübt.

Letztlich ist über das Ergebnis einer genetischen Studie biologisch funktionell zu spekulieren, warum diese Region des Genoms wichtig für diese Erkrankung ist und eine funktionelle Hypothese darstellt. Problematisch ist dabei unsere eingeschränkte Kenntnis über die Aufgabe weiterer Bestandteile des humanen Genoms (Siedek, 2015). Genetische Assoziationsstudien führen im Idealfall zu einem SNP, welcher in einer funktionell aktiven genetischen Region liegt. Dies ist jedoch eher selten der Fall, zu rund 88% lagen SNPs genetischer Assoziationsstudien bisher in nicht kodierenden, intergenetischen Bereichen (Hindorff et al., 2009). Inwieweit einige „indirekte“ SNPs die Genese von Erkrankungen beeinflussen, ist komplex und zum Teil noch nicht verstanden, jedoch von aktuell großem wissenschaftlichen Interesse. Schlussendlich bedarf es einer funktionellen Verifizierung der Variante, die eine regulatorische ätiologische Partizipation bestätigen kann, wie beispielsweise in in vitro Experimenten oder tierexperimentellen Ansätzen. Da SNPs neben entstehungs- auch gewebeeigene Prozesse zu Grunde liegen können, ist dieser Zusammenhang experimentell jedoch häufig nicht hinreichend evaluierbar (Fritsche, 2009).

Weitere Abgrenzung bedarf es zu sekundären Effekten durch Gen-Gen, Gen-Umwelt Interaktionen, Epigenetik und Epistatik. Es ist möglich, dass nur zu spezifischen Gegebenheiten eine Erscheinungsform oder ein Effekt hervortritt. So wird geschätzt, dass verschiedene Expression in 18% der Fälle einer nicht-synonym kodierten Variante beobachtet wird (Dimas et al., 2008). Die Regulation der Genexpression ist bisher weitgehend unverstanden. Bekannt ist dieses Phänomen zum Beispiel bei der

## 4 Diskussion

Koronaren Herzerkrankung, bei der eine Heritabilität bis zu 49% angenommen wird (Mayer et al., 2007), aber außer einigen Genen mit geringfügigem Einfluss bisher keine hauptverantwortlichen Gene gefunden wurden (Fischer et al., 2005) (Fritsche, 2009). Solche Auswirkungen werden in Assoziationsstudien nur eingeschränkt erschlossen, denn eine Assoziationsanalyse beschreibt nur einen Zusammenhang, keine Kausalität. So stellt die Identifikation von Suszeptibilitätsloci nur den ersten Schritt zu der entsprechenden Entschlüsselung der Pathophysiologie dar.

### 4.3 Klinische Charakteristika der rs4878404 Allelträger

CA-/AA - Allelträger von *rs4878404* VLBW Frühgeborenen haben ein verringertes Risiko an einem Atemnotsyndrom zu erkranken. Die höchste Effektstärke erreicht der SNP ab der Gestationswoche 29, möglicherweise, da sehr unreife Frühgeborene häufiger standardmäßig mit Surfactant therapiert werden.

Die Analyse der klinischen Parameter zeigt, dass keine signifikanten Unterschiede in der trachealen Beatmung vorliegen. Supportive therapeutische Maßnahmen sind etwas seltener bei protektiven Allelträgern zu finden, möglicherweise, da Intubationen weniger häufig in dieser Gruppe stattfinden. Jedoch nur die niedrigere Analgetikagabe ist statistisch signifikant ( $p=0,02$ ). Weitere differente Outcome- und Therapieregimeparameter der *rs4878404* Allelträger gibt es nicht; weder in kurz- und langfristigen kardiorespiratorischen postnatalen Daten noch in wichtigen Endpunkten wie Mortalität, Risiken für NEC, IVH, Sepsis und BPD lassen sich statistisch signifikante Unterschiede erheben. Letztlich ist spekulativ, ob sich durch eine adäquate Surfactantapplikation und Atemwegsunterstützung mögliche, langfristig unterschiedliche klinische Verläufe der verschiedenen Allelträger verhindern lassen.

### 4.4 Schlussfolgerung und Perspektiven

Zusammenfassend bedeutet das Ergebnis der GWAS für die Allelträger von *rs4878404* (20 % heterozygote Allelträger der europäischen Population) einen deutlichen Vorteil bezüglich der Entwicklung eines Atemnotsyndroms. So kann das Entstehungsmodell des ANS des VLBW Frühgeborenen (s. 1.2) um diesen hereditären Faktor ergänzt werden.

Von der direkten klinischen Anwendung der GWAS ist die Forschung noch mehrere Schritte entfernt. Problematisch ist die Vermarktung der GWAS zur

#### 4 Diskussion

Krankheitsrisikenerkennung. Evidenz ist vorher notwendig, dass solch eine Screeninguntersuchung zusätzlich zu bekannten Risikofaktoren sinnvoll ist, dass effektive Interventionen möglich sind und verbessertes Outcome die Kosten rechtfertigt. Außerdem darf das erhaltene Ergebnis mit keinen schwerwiegenden begleitenden Komorbiditäten für die Patienten und Familien einhergehen. Trägt ein Mensch eine Risikovariante, ist das Risiko zu einer Erkrankung lediglich prädisponiert. Je mehr Risikofaktoren zusammenkommen, desto wahrscheinlicher wird eine Erkrankung. So ist neben einer Primär- auch eine Sekundärprävention möglich. Das Ziel in der Neonatologie einer individualisierten Therapie von Frühgeborenen ist besonders bei der lebensnotwendigen, aber auch potentiell schädigenden Beatmungs- und medikamentösen Therapie des Atemnotsyndroms Frühgeborener relevant. Dafür kann das genetische Screening im Rahmen einer *precision therapy* in der Zukunft einen wichtigen Beitrag liefern, um die Mortalität und Langzeit-Morbidität von Frühgeborenen zu verbessern.

Eine weitere Zukunft der GWAS kann in der Erforschung unbekannter pathophysiologischer Pathways liegen. Durch neue Angriffspunkte können Pharmaka entwickelt werden, die neue Therapiemethoden und individuelle Interventionsmöglichkeiten bieten. Es konnten bereits einzelne pharmakologische Erfolge erzielt werden, wie beispielsweise die Entwicklung von Inhibitoren von Komplementfaktoren bei der altersabhängigen Makuladegeneration (Gehrs et al., 2006) (Wang et al., 2011).

Die Identifizierung von Suszeptibilitätsloci ist nur der Anfang eines Prozesses zur weiteren funktionellen Studienanalyse und möglicherweise pharmakologischen und präventiven Nutzung der neuen Erkenntnisse. Diese Evidenz ist es, auf die sich nach den Ergebnissen der GWAS die Forschung der nächsten Jahre konzentriert (Pearson und Manolio, 2008) (Pal et al., 2015).

## 5 Zusammenfassung

Das Frühgeborene ist nach der Geburt aufgrund der allgemeinen Unreife besonders vulnerabel. Eine der größten Bedrohungen ist das Atemnotsyndrom (ANS), bedingt durch das noch nicht voll entwickelte Lungensystem. Obwohl eine genetische Prädisposition für das ANS angenommen wird, konnte bisher noch kein häufiger hereditärer Einflussfaktor gefunden werden.

Ziel dieser Dissertation war es, genetische Faktoren zum Auftreten des Atemnotsyndroms des Frühgeborenen zu untersuchen.

Hierfür wurden von Dezember 2009 bis September 2015 Daten von insgesamt 7481 VLBW Frühgeborenen aus 57 neonatologischen Kliniken in Deutschland gesammelt und in die Analyse einbezogen. Es wurden in drei standardisierten Fragebögen antenatale Daten, Geburtsumstände und postnataler Verlauf erfasst und DNA (Mundschleimhautabstrich, Nabelschnur) von Mutter und Kind asserviert. Für die Assoziationsstudie erfolgte die Genotypisierung von insgesamt 1272 VLBW Frühgeborenen (2009-2010). Einen statistisch signifikanten p-Wert ( $< 10^{-5}$ ) erreichten 10 SNPs. In der Replikationsanalyse wurden zunächst 10 Suszeptibilitätsloci der GWAS in einer unabhängigen Gruppe von insgesamt 2112 Frühgeborenen genotypisiert. Der SNP *rs4878404* wurde zur Validierung bei weiteren 4112 VLBW Frühgeborenen erneut genotypisiert.

Die GWAS und Replikation von *rs4878404* ergaben eine signifikante Assoziation zu einer reduzierten exogenen Surfactanttherapie VLBW Frühgeborener (Odds Ratio (OR): 0.7; 95% Konfidenzintervall (KI) 0.65-0.86;  $p=3,3 \times 10^{-5}$ ).

Für den SNP sind keine kodierenden Gene bekannt, das nächste Gen liegt mehrere Kilobasenpaare entfernt.

Zusammenfassend konnte erstmalig ein häufig in der Bevölkerung vorkommender genetischer Faktor, der Polymorphismus *rs4878404*, mit Einfluss auf das Auftreten des Atemnotsyndroms des Frühgeborenen identifiziert werden. Unsere Daten zeigen, dass das Atemnotsyndrom VLBW Frühgeborener durch häufige genetische Varianten maßgeblich mit beeinflusst wird.

## 6 Literaturverzeichnis

**Aldana-Aguirre** JC, Pinto M, Featherstone RM, Kumar M: Less invasive surfactant administration versus intubation for surfactant delivery in preterm infants with respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 102, 17-23 (2017)

**Aly** H, Massaro AN, Patel K, El-Mohandes AAE: Is it safer to intubate premature infants in the delivery room? *Pediatrics* 115, 1660-5 (2005)

**Anadkat** JS, Kuzniewicz MW, Chaudhari BP, Cole FS, Hamvas A: Increased risk for respiratory distress among white, male, late preterm and term infants. *J Perinatol* 32, 780–5 (2012)

**Ataseven** F, Salis O, Aygun C, Bedir A, Kucukoduk S: Clinical significance of glucocorticoid receptor expression in premature infants with respiratory distress syndrome. *J Matern Fetal Neonatal Med* 30, 430-3 (2017)

**Autilio** C, Echaide M, Benachi A, Marfaing-Koka A, Capoluongo ED, Perez-Gil J, et al.: A Noninvasive Surfactant Adsorption Test Predicting the Need for Surfactant Therapy in Preterm Infants Treated with Continuous Positive Airway Pressure. *J Pediatr* 182, 66-73 (2017)

**Avery** ME, Mead J: Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *AMA J Dis Child* 97, 517–23 (1959)

**Ballard** RA, Ballard PL: Antenatal hormone therapy for improving the outcome of the preterm infant. *J Perinatol* 16, 390–6 (1996)

**Berube** JC, Gaudreault N, Lavoie-Charland E, Sbarra L, Henry C, Madore AM, et al.: Identification of Susceptibility Genes of Adult Asthma in French Canadian Women. *Can Respir J* 2016 1-12 (2016)

**Blencowe** H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller AB, Narwal R, et al.: National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet* 379, 2162–72 (2012)

**Boggaram V:** Thyroid transcription factor-1 (TTF-1/Nkx2.1/TITF1) gene regulation in the lung. *Clin Sci* 116, 27–35 (2009)

**Bokodi G, Derzbach L, Banyasz I, Tulassay T, Vasarhelyi B:** Association of interferon T+874A and interleukin 12 p40 promoter CTCTAA/GC polymorphism with the need for respiratory support and perinatal complications in low birthweight neonates. *Arch Dis in Child Fetal Neonatal Ed* 92, 25–9 (2007)

**Brasch F, Schimanski S, Mühlfeld C, Barlage S, Langmann T, Aslanidis C, et al.:** Alteration of the pulmonary surfactant system in full-term infants with hereditary ABCA3 deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 174, 571–80 (2006)

**Bullard JE, Wert SE, Whitsett JA, Dean M, Noguee LM:** ABCA3 mutations associated with pediatric interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 172, 1026–31 (2005)

**Cardon LR, Palmer LJ:** Population stratification and spurious allelic association. *Lancet* 361, 598–604 (2003)

**Chang Y, Ahn SY, Yoo HS, Sung SI, Choi SJ, Oh WI, et al.:** Mesenchymal stem cells for bronchopulmonary dysplasia: phase 1 dose-escalation clinical trial. *J Pediatr* 164, 966–72 (2014)

**Chang HY, Li F, Li FS, Zheng CZ, Lei YZ, Wang J:** Genetic Polymorphisms of SP-A, SP-B and SP-D and Risk of Respiratory Distress Syndrome in Preterm Neonates. *Med Sci Monit* 22, 5091-100 (2016)

**Chiruvolu A, Qin H, Nguyen ET, Inzer RW:** The Effect of Delayed Cord Clamping on Moderate and Early Late-Preterm Infants. *Am J Perinatol* 35, 286-91 (2018)

**Clarke GM, Carter KW, Palmer LJ, Morris AP, Cardon LR:** Fine mapping versus replication in whole-genome association studies. *Am J Hum Genet* 81, 995–1005 (2007)

**Collins F, Brooks LD, Chakravarti A:** A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res* 8, 1229-31 (1998)

**Condo V**, Cipriani S, Colnaghi M, Bellu R, Zanini R, Bulfoni C, et al.: Neonatal respiratory distress syndrome: are risk factors the same in preterm and term infants? *J Matern Fetal Neonatal Med* 30, 1267-72 (2017)

**Dani C**, Reali MF, Bertini G, Wiechmann L, Spagnolo A, Tangucci M, et al.: Risk factors for the development of respiratory distress syndrome and transient tachypnoea in newborn infants. *Eur Respir J* 14, 155–9 (1999)

**Davis JM**, Parad RB, Michele T, Allred E, Price A, Rosenfeld W for the North American Recombinant Human CuZnSOD Study Group: Pulmonary outcome at 1 year corrected age in premature infants treated at birth with recombinant human CuZn superoxide dismutase. *Pediatrics* 111, 469–75 (2003)

**de Bakker PI**, Ferreira MA, Jia X, Neale BM, Raychaudhuri S, Voight BF: Practical aspects of imputation-driven meta-analysis of genome-wide association studies. *Hum Mol Genet* 17, 122–8 (2008)

**Delara M**, Chauhan BF, Le ML, Abou-Setta AM, Zarychanski R, Tjong GW: Efficacy and safety of pulmonary application of corticosteroids in preterm infants with respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 4, 1-15 (2018)

**Dimas A**, Stranger B, Beazley C, Finn RD, Ingle CE, Forrest MS, et al.: Modifier effects between regulatory and protein-coding variation. *PLoS Genet* 4, e1000244 (2008)

**Donald I**, Lord J: Augmented respiration studies in atelectasis neonatorum. *Lancet* 1, 9–17 (1953)

**Duan J**, Kong X, Li Q, Hua S, Zhang S, Feng Z, et al.: Association between Hemoglobin Levels in the First 3 Days of Life and Bronchopulmonary Dysplasia in Preterm Infants. *Am J Perinatol* 33, 998-1002 (2016)

**Dudenhausen JW**, Friese K, Kirschner W: Preconceptional health promotion and counselling pregnant women in choosing their obstetric clinic as further tools in the reduction of preterm deliveries. *Z Geburtshilfe Neonatol* 211, 142–6 (2007)

**Dunbar** AE, Wert SE, Ikegami M, Whitsett JA, Hamvas A, White FV, et al.: Prolonged survival in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency associated with a novel splicing mutation. *Pediatr Res* 48, 275–82 (2000)

**Endesfelder** S: Protektive Strategien im Hyperoxie-Schädigungsmodell der neonatalen Ratte. Nat.Habil. Berlin (2018)

**Esselborn** H: Hypotension sehr kleiner Frühgeborener am ersten Lebenstag - Eine Genomweite Assoziationsstudie. Med. Diss. Lübeck (2015)

**EuroNeoStat**. Annual Report for Very Low Gestational Age Infants 2010. The ENS Project. Barakaldo, Spain (2010)

**Fatahi** N, Niknafs N, Kalani M, Dalili H, Shariat M, Amini E, et al.: Association of SP-B gene 9306 A/G polymorphism (rs7316) and risk of RDS. *J Matern Fetal Neonatal Med* 31, 2965-70 (2017)

**Ferreira** MA, Vonk JM, Baurecht H, Marenholz I, Tian C, Hoffman JD, et al.: Shared genetic origin of asthma, hay fever and eczema elucidates allergic disease biology. *Nat Genet* 49, 1752-7 (2017)

**Finer** N: To intubate or not—that is the question: continuous positive airway pressure versus surfactant and extremely low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 91, 392-4 (2007)

**Finer** NN, Merritt TA, Bernstein G, Job L, Mazela J, Segal R: An open label, pilot study of Aerosurf® combined with nCPAP to prevent RDS in preterm neonates. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 23, 303-9 (2010)

**Fischer** M, Broeckel U, Holmer S, Baessler A, Hengstenberg C, Mayer B, et al.: Distinct heritable patterns of angiographic coronary artery disease in families with myocardial infarction. *Circulation* 111, 855-62 (2005)

**Floros** J: Human surfactant protein A (SP-A) variants: why so many, why such a complexity? *Swiss Med Wkly* 131, 87–90 (2001)

**Floros** J, Veletza SV, Kotikalapudi P, Krizkova L, Karinch AM, Friedman C, et al.: Dinucleotide repeats in the human surfactant protein-B gene and respiratory-distress syndrome. *Biochem J* 305, 583–90 (1995)

**Freeman C:** Genetics Software Suite GTOOL Version 0.7.5. Oxford University. <http://www.well.ox.ac.uk/~cfreeman/software/gwas/gtool.html> (Tag des Zugriffs: 13.10.2017)

**Fritsche L:** Untersuchungen zu den genetischen Ursachen der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD). Nat.Diss. Regensburg (2009)

**Fujikura T, Froehlich LA:** The influence of race and other factors on pulmonary hyaline membranes. A report from the Collaborative Study of Cerebral Palsy. Am J Obstet Gynecol 95, 572–8 (1966)

**Fujiwara T, Adams FH:** Surfactant for hyaline membrane disease. Pediatrics 66, 795–8 (1980)a

**Fujiwara T, Maeta H, Chida S, Morita T, Watabe Y, Abe T:** Artificial surfactant therapy in hyaline-membrane disease. Lancet 1, 55–9 (1980)b

**Garmany TH, Wambach JA, Heins HB, Watkins-Torry JM, Wegner DJ, Bennet K, et al.:** Population and disease-based prevalence of the common mutations associated with surfactant deficiency. Pediatr Res 63, 645–9 (2008)

**Gehrs KM, Anderson DH, Johnson LV, Hageman GS:** Age-related macular degeneration - emerging pathogenetic and therapeutic concepts. Ann Med 38, 450-71 (2006)

**Gortner L, Herting E:** Surfactanttherapie des Atemnotsyndroms Frühgeborener (RDS). Leitlinie der Gesellschaft für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin (GNPI) und der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin (DGKJ) 04/021 (2017)

**Gregory GA, Kitterman JA, Phibbs RH, Tooley WH, Hamilton WK:** Treatment of the ideopathic respiratory-distress syndrome with continuous positive airway pressure. N Engl J Med 284, 1333-40 (1971)

**Haataja R, Rämetsä M, Marttila R, Hallman M:** Surfactant proteins A and B as interactive genetic determinants of neonatal respiratory distress syndrome. Hum Mol Genet 9, 2751–60 (2000)

**Hallman M**, Haataja R: Genetic basis of respiratory distress syndrome. *Front Biosci* 12, 2670-82 (2007)

**Hamvas A**: Current technology in the diagnosis of developmentally related lung disorders. *Neonatology* 101, 353–9 (2012)

**Hamvas A**, Cole FS, Noguee LM: Genetic Disorders of surfactant proteins. *Neonatology* 91, 311–7 (2007)

**Hansel NN**, Paré PD, Rafaels N, Sin DD, Sandford A, Daley D, et al.: Genome-Wide Association Study Identification of Novel Loci Associated with Airway Responsiveness in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J of Respir Cell Mol Biol* 53, 226-34 (2015)

**Harding D**: Impact of common genetic variation on neonatal disease and outcome. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 92, 408–13 (2007)

**Harding D**, Dhamrait S, Marlow N, Whitelaw A, Gupta S, Humphries S, et al.: Angiotensin-converting enzyme DD genotype is associated with worse perinatal cardiorespiratory adaptation in preterm infants. *J Pediatr* 143, 746–9 (2003)

**Herzog U**: Genomweite Assoziationsstudie zu zerebraler Malaria und Charakterisierung eines assoziierten Locus auf Chromosom 2p22.3. Dr.rer.nat.Diss. Hamburg (2012)

**Heßler N**: Genome-wide association analyses in sepsis: From quality control to meta-Analysis. Bachel. Lübeck (2011)

**Hilgendorff A**, Heidinger K, Bohnert A, Kleinsteiber A, König IR, Ziegler A, et al.: Association of polymorphisms in the human surfactant protein-D (SFTPD) gene and postnatal pulmonary adaptation in the preterm infant. *Acta Paediatr* 98, 112–7 (2009)

**Hindorff LA**, Sethupathy P, Junkins HA, Ramos EM, Mehta JP, Collins FS, et al.: Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 9362-7 (2009)

**Hirschhorn JN**: Genetic approaches to studying common diseases and complex traits. *Pediatr Res* 57, 74–7 (2005)

**Howie** BN, Donnelly P, Marchini J: A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. *PLoS Genet* 5, 1-15 (2009)

**Huizing** MJ, Cavallaro G, Moonen RM, Gonzalez-Luis GE, Mosca F, Vento M, et al.: Is the C242T Polymorphism of the CYBA Gene Linked with Oxidative Stress-Associated Complications of Prematurity? *Antioxid Redox Signal* 27, 1432-8 (2017)

**Hunter** DJ: Gene-environment interactions in human diseases. *Nat Rev Genet* 6, 287-98 (2005)

**IBM Corp.:** IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp. (2017)

**IQTIG:** Qualitätsreport Neonatologie 2016  
[www.iqtig.org/berichte/qualitaetsreport](http://www.iqtig.org/berichte/qualitaetsreport) (Tag des Zugriffs: 29.10.2017)

**Jo** HS: Genetic risk factors associated with respiratory distress syndrome. *Korean J Pediatr* 57, 157-63 (2014)

**Jo** HS, Cho SI, Chang YH, Kim BI, Choi JH: Surfactant Protein A associated with respiratory distress syndrome in Korean preterm infants: evidence of ethnic difference. *Neonatology* 103, 44-7 (2013)

**Kala** P, Ten Have T, Nielsen H, Dunn M, Floros J: Association of pulmonary surfactant protein A (SP-A) gene and respiratory distress syndrome: interaction with SP-B. *Pediatr Res* 43, 169-77 (1998)

**Karjalainen** MK, Haataja R, Hallman M: Haplotype analysis of ABCA3: association with respiratory distress in very premature infants. *Ann Med* 40, 56-65 (2008)

**Kavvadia** V, Greenough A, Dimitriou G, Hooper R: Influence of ethnic origin on respiratory distress syndrome in very premature infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 78, 25-8 (1998)

**Kaya G**, Sivasli E, Oztuzcu S, Melekoglu NA, Ozkara E, Sarikabadayi U, et al.: Association of Rho-kinase Gene Polymorphisms with Respiratory Distress Syndrome in Preterm Neonates. *Pediatr Neonatol* 58, 36-42 (2017)

**Khoshdel A**, Kheiri S, Omidvari P, Moradi F, Hamidi M, Teimori H: Association between Interleukin-10-1082 G/A and Tumor Necrosis Factor-Alpha 308 G/A Gene Polymorphisms and Respiratory Distress Syndrome in Iranian Preterm Infants. *Mediators Inflamm*, e6386453 (2017)

**Kribs A**, Härtel C, Kattner E, Vochem M, Küster H, Möller J et al.: Surfactant without Intubation in Preterm Infants with Respiratory Distress: First Multi-center Data. *Klin Padiatr* 222, 13-7 (2010)

**Kriebel J**, Illig T, Grallert H: Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) - Möglichkeiten und Grenzen. *Biospektrum* 18, 508–10 (2012)

**Lahti M**, Marttila R, Hallman M: Surfactant protein C gene variation in the Finnish population - association with perinatal respiratory disease. *Eur J Hum Genet* 12, 312–20 (2004)

**Lander ES**, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921 (2001)

**Laszlo V**, Szalai C, Pap E, Toth S, Falus A, Oberfrank F: Populations- und Evolutionsgenetik In: Szalai C (Hrsg.): *Genetik und Genomik*. 1.Aufl., 127, Typotex Verlag, Budapest (2013)

**Leu C**, de Kovel CG, Zara F, Striano P, Pezzella M, Robbiano A, et al.: Genome-wide linkage meta-analysis identifies susceptibility loci at 2q34 and 13q31.3 for genetic generalized epilepsies. *Epilepsia* 53, 308–18 (2012)

**Leu C**: Molekulargenetische Exploration der ideopathisch generalisierten Epilepsien. *Med. Diss. Köln* (2012)

**Levit O**, Jiang Y, Bizzarro MJ, Hussain N, Buhimschi CS, Gruen JR, et al.: The genetic susceptibility to respiratory distress syndrome. *Pediatr Res* 66, 693–7 (2009)

**Levine** CR, Gewolb IH, Allen K, Welch RW, Melby JM, Pollack S, et al.: The safety, pharmacokinetics and anti-inflammatory effects of intratracheal recombinant human Clara cell protein in premature infants with respiratory distress syndrome. *Pediatr Res* 58, 15-21 (2005)

**Li** W, Long C, Renjun L, Zhangxue H, Yin H, Wanwei L, et al.: Association of SCNN1A Single Nucleotide Polymorphisms with neonatal respiratory distress syndrome. *Sci Rep* 5, 1-7 (2015)

**Liggins** GC, Howie RN: A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics* 50, 515–25 (1972)

**Lohmüller** KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschorn JN: Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet* 33, 177-82 (2003)

**Makri** V, Hospes B, Stoll-Becker S, Borkhardt A, Gortner L: Polymorphisms of surfactant protein B encoding gene: modifiers of the course of neonatal respiratory distress syndrome? *Eur J Pediatr* 161, 604–8 (2002)

**Manolio** TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, et al.: Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 461, 747–53 (2009)

**Marchini** J, Howie B: Genotype imputation for genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* 11, 499–511 (2010)

**Marttila** R, Haataja R, Guttentag S, Hallman M: Surfactant protein A and B genetic variants in respiratory distress syndrome in singletons and twins. *Am J Respir Crit Care Med* 168, 1216–22 (2003)a

**Marttila** R, Haataja R, Rämetsä M, Pokela ML, Tammela O, Hallman M: Surfactant protein A gene locus and respiratory distress syndrome in Finnish premature twin pairs. *Ann Med* 35, 344–52 (2003)b

**Matti** P, Pistoia L, Fornale M, Brunn E, Zardini E: Prevalence of RDS in diabetic pregnancy. *Minerva Ginecol* 48, 409–13 (1996)

**Mayer B**, Erdmann J, Schunkert H: Genetics and heritability of coronary artery disease and myocardial infarction. *Clin Res Cardiol* 96, 1-7 (2007)

**Mehrabadi A**, Lisonkova S, Joseph KS: Heterogeneity of respiratory distress syndrome: risk factors and morbidity associated with early and late gestation disease. *BMC Pregnancy Childbirth* 16, 1-10 (2016)

**Meienberg J**, Bruggmann R, Oexle K, Matyas G: Clinical sequencing: Is WGS the better WES? *Hum Genet* 135, 359-62 (2016)

**Metcalfe A**, Lisonkova S, Sabr Y, Stritzke A, Joseph KS: Neonatal respiratory morbidity following exposure to chorioamnionitis. *BMC Pediatr* 17, 1-7 (2017)

**Morales WJ**, Diebel ND, Lazar AJ, Zadrozny D: The effect of antenatal dexamethasone administration on the prevention of respiratory distress syndrome in preterm gestations with premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 154, 591–5 (1986)

**Morley CJ**, Davis PG, Doyle LW, Brion LP, Hascoet JM, Carlin JB: Nasal CPAP or intubation at birth for very preterm infants. *N Engl J Med* 358, 700-8 (2008)

**Myriantopoulos NC**, Churchill JA, Baszynski AJ: Respiratory distress syndrome in twins. *Acta Genet Med Gemellol* 20, 199–204 (1971)

**Nagourney BA**, Kramer MS, Klebanoff MA, Usher RH: Recurrent respiratory distress syndrome in successive preterm pregnancies. *J Pediatr* 129, 591–6 (1996)

**National Institute of Health**: National Human Genome Research Institute, Genome-wide Association Studies: <https://www.genome.gov/20019523/> (Tag des Zugriffs: 30.10.2017)

**Nature**: Scitable by Nature Education, polymerase chain reaction, PCR <https://www.nature.com/scitable/definition/polymerase-chain-reaction-pcr-110> (Tag des Zugriffs 02.01.2018)

**Neergaard K**: Neue Auffassungen über einen Grundbegriff der Atemmechanik. *Zeitschrift Für Die Gesamte Experimentelle Medizin* 66, 373–94 (1929)

**Nogee** LM, de Mello DE, Dehner LP, Colten HR: Brief report: deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *N Engl J Med* 328, 406–10 (1993)

**Obladen** M: History of Surfactant up to 1980. *Biol Neonate* 87, 308-16 (2005)

**Owen** LS, Manley BJ, Davis PG, Doyle LW: The evolution of modern respiratory care for preterm infants. *Lancet* 389, 1649-59 (2017)

**Pal** LR, Yu CH, Mount SM, Moulton J: Insights from GWAS: emerging landscape of mechanisms underlying complex trait disease. *BMC Genomics* 16, 1-15 (2015)

**Pearson** TA, Manolio TA: How to interpret a genome-wide association study. *JAMA* 299, 1335–44 (2008)

**Pritchard** JK, Cox NJ: The allelic architecture of human disease genes: common disease-common variant...or not? *Hum Mol Genet* 11, 2417-23 (2002)

**Pulkkinen** V, Haataja R, Hannelius U, Helve O, Pitkänen OM, Karikoski R, et al.: G protein-coupled receptor for asthma susceptibility associates with respiratory distress syndrome. *Ann Med* 38, 357–66 (2006)

**Purcell** S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D et al.: PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *Am J Hum Genet* 81, 559-75 (2007)

**Quinlan** A: Deriving kinship coefficients from samples and genotypes in a VCF file. <http://cphg.virginia.edu/quinlan/?p=300> (Tag des Zugriffs: 02.01.2018)

**R Core Project**: A language and environment for statistical computing (2013). R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [www.R-Project.org](http://www.R-Project.org) (Tag des Zugriffs 30.10.2017)

**Rämet** M, Haataja R, Marttila R, Floros J, Hallman M: Association between the surfactant protein A (SP-A) gene locus and respiratory-distress syndrome in the Finnish population. *Am J Hum Genet* 66, 1569–79 (2000)

**Rezvani M**, Wilde J, Vitt P, Mailaparambil B, Grychtol R, Krueger M, et al.: Association of a FGFR-4 gene polymorphism with bronchopulmonary dysplasia and neonatal respiratory distress 35, 633–40 (2013)

**Rova M**, Haataja R, Marttila R, Ollikainen V, Tammela O, Hallman M: Data mining and multiparameter analysis of lung surfactant protein genes in bronchopulmonary dysplasia. *Hum Mol Genet* 13, 1095–104 (2004)

**Sardesai S**, Biniwale M, Wertheimer F, Garingo A, Ramanathan R: Evolution of surfactant therapy for respiratory distress syndrome: past present and future. *Pediatr Res* 81, 240-8 (2017)

**Schulz KF**, Grimes DA: Failures in sample size calculation in randomized trial: mandatory and mystical. *Z Arztl Fortbild Qualitatssich* 100, 129–35 (2006)

**Seehase M**, Collins JJ, Kuypers E, Jellema RK, Ophelders DR, Ospina OL, et al.: New surfactant with SP-B and C analogs gives survival benefit after inactivation in preterm lambs. *PLoS One* 7, 1-11 (2012)

**Shen CL**, Zhang Q, Meyer Hudson J, Cole FS, Wambach JA: Genetic Factors contribute to risk for neonatal respiratory distress syndrome among moderately preterm, late preterm and term infants. *J Pediatr* 172, 69-74 (2016)

**Siedek F**: Effekte von genetischen Risikofaktoren für Schizophrenie und Bipolare Störung auf die kortikale Dicke in gesunden Probanden. *Med. Diss. Bonn* (2015)

**Silverman WA**, Andersen DH: A controlled clinical trial of effects of water mist on obstructive respiratory signs, death rate and necropsy findings among premature infants. *Pediatrics* 17, 1-10 (1956)

**Speakman JR**: Functional analysis of seven genes linked to body mass index and adiposity by genome-wide association studies: a review. *Hum Hered* 75, 57-79 (2013)

**Speer CP**: Neonatologie In: Speer CP, Gahr M, Dötsch J (Hrsg.): *Pädiatrie*. 5.Aufl., 159-167, Springer Verlag, Berlin Heidelberg (2019)

**Spiegler J, Härtel C, Schulz L, von Wurmb-Schwark N, Hoehn T, Kribs A, et al.:** Causes of delivery and outcomes of very preterm twins Stratified to zygosity. *Twin Res Hum Genet* 15, 532–6 (2012)

**Sweet DG, Carnielli V, Greisen G, Hallman M, Ozek E, Plavka R, et al.:** European Consensus Guidelines on the Management of Respiratory Distress Syndrome - 2019 Update. *Neonatology* 111, 107–25 (2019)

**Sweet DG, Turner MA, Stranak Z, Plavka R, Clarke P, Stenson BJ, et al.:** A first-in-human clinical study of a new SP-B and SP-C enriched synthetic surfactant (CHF5633) in preterm babies with respiratory distress syndrome. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 102, 497-503 (2017)

**The 1000 Genomes Project Consortium:** An integrated map of genetic variation from 1092 human genomes. *Nature* 491, 56-65 (2012)

**The International HapMap Consortium:** A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449, 851-61 (2007)

**The Wellcome Trust Case Control Consortium:** Genome-wide association study of 14.000 cases of seven common diseases and 3.000 shared controls. *Nature* 447, 661-78 (2007)

**Tian W, Chen X, Qin H, Wei Q, Zhang S, Tang S, et al.:** The Haplotype TGGAG in the ABCA3 Gene Increases the Risk of Respiratory Distress Syndrome in Preterm Infants in Southern China. *Pediatr Neonatol* 57, 188-94 (2016)

**Tsitoura MI, Stavrou EF, Maraziotis IA, Sarafidis K, Athanassiadou A, Dimitriou G:** Surfactant protein A and B Gene Polymorphisms and Risk of Respiratory Distress Syndrome in Late-Preterm Neonates. *PLoS One* 11, 1-11 (2016)

**Tutdibi E, Gortner L:** Atemstörungen des Neugeborenen – spielen genetische Faktoren eine Rolle? *Magazin Forschung Universität des Saarlandes* 1, 6–8 (2008)

**van Sonderen L, Halsema EF, Spiering EJ, Koppe JG:** Genetic influences in respiratory distress syndrome: a twin study. *Semin Perinatol* 26, 447–9 (2002)

**van Wassenaer-Leehuis** AG, Marlow N, Lees C, Wolf H: The association of neonatal morbidity with long-term neurological outcome in infants who were growth restricted and preterm at birth: secondary analysis from TRUFFLE (Trial of Randomized Umbilical and Fetal Flow in Europe). *BJOG* 124, 1072-8 (2017)

**Venter** JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al.: The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304–51 (2001)

**Vilarino-Guell** C, Wider C, Ross OA, Jasinska-Myga B, Kachergus J, Cobb SA, et al.: LINGO1 and LINGO2 variants are associated with essential tremor and parkinson disease. *Neurogenetics* 11, 401-8 (2010)

**Wallace** ME, Mendola P, Kim SS, Epps N, Chen Z, Smarr M, et al.: Racial/ethnic differences in preterm perinatal outcomes. *Am J Obstet Gynecol* 216, 1-12 (2017)

**Wang** L, McLeod HL, Weinshilboum RM: Genomics and drug response. *N Engl J Med* 364, 1144-53 (2011)

**Wang** S, Bhutta ZA, Coates MM, Coggeshall M, Dandona L, Diallo K, et al.: Global, regional, national and selected subnational levels of stillbirths, neonatal, infant and under-5 mortality, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 388, 1725-74 (2016)

**Wauer** RR, Gortner L, Schmalisch G: Surfactanttherapie beim neonatalen Atemnotsyndrom In: Wauer RR (Hrsg.): Surfactanttherapie: Grundlagen, Diagnostik, Therapie. 3te Auflage, 109-133, Thieme, Stuttgart (2004)

**Whitsett** JA, Wert SE, Weaver TE: Diseases of pulmonary surfactant homeostasis. *Annu Rev Pathol* 10, 371–93 (2015)

**WHO** <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth> (Tag des Zugriffs: 28.05.2018)

**Yanamandra** K, Loggins J, Baier RJ: The Angiotensin Converting Enzyme Insertion/Deletion polymorphism is not associated with an increased risk of death or bronchopulmonary dysplasia in ventilated very low weight infants. *BMC Pediatr* 4, 26 (2004)

**Yimenicioglu S**, Oztuzcu S, Sivasli E, Igci M, Igci YZ, Demiryürek S, et al.: ACE gene polymorphism in premature neonates with respiratory distress syndrome. *Genet Test Mol Biomarkers* 15, 867-70 (2011)

**Zeitlin J**, Mohangoo A, Delnord M: European Perinatal Health Report. Health and Care of Pregnant Women and Babies in Europe in 2010, Committee Euro-Peristat. 1–252 (2013). [www.europeristat.com](http://www.europeristat.com) (Tag des Zugriffs 15.10.2017)

**Zheng X**, Levine D, Shen J, Gogarten SM, Laurie C, Weir BS: A high-performance computing toolset for relatedness and principal component analysis of SNP data. *Bioinformatics* 28, 3326–8 (2012)

**Zhou B**, Zhai JF, Wu JB, Jin B, Zhang YY: Different ventilation modes combined with ambroxol in the treatment of respiratory distress syndrome in premature infants. *Exp Ther Med* 13, 629-33 (2017)

**Ziegler A**: Genome-wide association studies: quality control and population-based measures. *Genet Epidemiol* 33, 1–11 (2009)

**Ziegler A**, König IR: Genome-wide Association (GWA) Studies. In: *A Statistical Approach to Genetic Epidemiology: Concepts and Applications*, 2. Auflage, 367-391, Wiley-Blackwell Verlag, Chichester U.K. (2010)

## 7 Anhang

### 7.1 Genomische DNA Isolierung

#### 7.1.1 Genomische DNA aus Nabelschnurproben

Die Nabelschnur wurde auf eine Menge von 100mg kleingeschnitten. Für die Zellyse wurde sie mit 3 ml Puregene Zellyse-Lösung in einer 15ml Tube auf Eis gegeben, 30 µl Proteinase K hinzugefügt sowie direkt danach für 15 Sekunden gevortext und bei 55°C im Thermoschüttler inkubiert (Speed 600 U/min). Am nächsten Morgen wurde zur Fällung der RNA 15 µl RNase A hinzugegeben, 15 Sekunden gevortext und für eine Stunde bei 37°C im Thermoschüttler inkubiert (Speed 600U/min). Nach Herunterkühlen für 3 Minuten im Eis erfolgte die Proteinfällung, indem 1ml Protein Precipitation Lösung hinzugefügt und sofort für 20 Sekunden hochtourig gevortext wurde, um im Anschluss 10 Minuten für 5000 U/Min zu zentrifugieren. Die Proteine waren nun am Grund des Gefäßes ausgefällt. Die DNA konnte abpipettiert werden, die Proteinfällung wurde einmal wiederholt. Im nächsten Schritt konnte die DNA gefällt werden, indem 3ml Isopropanolol 100% in ein neues 15ml Zentrifugenröhrchen gegeben, der DNA-Überstand dazugegeben und vorsichtig umgedreht und geschwenkt wurde, um danach für 5 Minuten bei 5000U/min zu zentrifugieren. Die DNA war am Boden des Gefäßes ausgefällt. Nach Entfernen des Überstandes wurde mit Hilfe von 3ml Ethanol 70% die DNA abschließend gewaschen, das Tube nach Zufügen erneut vorsichtig geschwenkt, 5 Minuten bei 5000U/min zentrifugiert, der Alkoholüberstand abpipettiert und abgetupft sowie der Ethanolwaschschritt einmal wiederholt, um im Anschluss für mindestens 10-15 Minuten luftzutrocknen. Im Abschluss wurde, um die DNA zu lösen, 150 µl DNA Hydration Lösung zugefügt, gevortext und bei 25°C im Thermoschüttler (Speed 300 U/Min) inkubiert. Abschließend erfolgte am Folgetag die DNA-Messung und Einstellung auf 50-70ng/µl.

#### 7.1.2 Genomische DNA aus Mundschleimhautabstrichen

Vor der Aufbereitung der DNA wurden vorbereitende Arbeiten getroffen: Der Thermoblock wurde auf 56°C erhitzt, Waschpuffer 1 und 2 mit Ethanol versetzt und die Protease gelöst.

## 7 Anhang

Zu Beginn der DNA-Isolation wurde der Mundschleimhautabstrich abgeknickt und in einem 2ml Mikrozentrifugengefäß mit 400 µl PBS, 400 µl AL Puffer und 20 µl Protease durch sofortiges Vortexen für 15 Sekunden vermischt, dann für 1 Stunde für 56°C im Thermoschüttler inkubiert. Nach dieser Zell- und Proteinlyse wurde 400 µl Ethanol 100% hinzugefügt, gevortext und für 1 Minute bei 8000 U/Min zentrifugiert. Im Anschluss wurde 600 µl dieser Probe auf das Qiamp®MiniSpinSäule aufgebracht und für 8000U/Min zentrifugiert, um die DNA in der Säule, die ein Silica-Gel enthält, welches nur DNA bindet, in dieser Säulenschicht zu kollektivieren. Der Schritt wurde wiederholt, bis die gesamte Mischung durch das Silica-Gel hindurch zentrifugiert war. Die Reste, die sich unter der Säule im Tube sammelten, wurden jeweils verworfen. Im Anschluss wurde die DNA gewaschen, zuerst mit aufgebrachtem 500 µl Waschpuffer 1 mit anschließender Zentrifugation über 8000U/Min für 1 Minute, dann mit 500 µl Waschpuffer 2 mit anschließender Zentrifugation über 13200 U/Min über 3 Minuten. Die Zentrifugatlösung wurde jeweils verworfen, die gereinigte DNA verblieb dann im Silicat-Gel.

Abschließend erfolgte die Lösung der DNA in 200 µl AE-Puffer, nach Zentrifugation über 1,5 Minuten bei 9600 U/Min.

## 7.2 Prä- und Perinatale klinische Charakteristika der rs4878404 Allelträger

**Tabelle 16:** Prä- und perinatale klinische Daten von VLBW Frühgeborenen stratifiziert nach rs4878404 Allelträgern

	CC (n=3675)	CA (n=1101)	AA (n=98)	p-Wert
Gestationsalter [Wochen]*	28,8/2,7	28,9/2,7	28,4/2,7	0,59
Geburtsgewicht [g]*	1064/305	1079/301	1043/306	n.sign.
Mädchen [%]	48,3	49,4	35,7	0,34
Mehrling [%]	25,6	25,8	15,3	0,07
Deutsche Herkunft [n/(%)]	3675 (100)	1101 (100)	98 (100)	n.sign.
Blasensprung [%/(n)]	27,8 (2420)	31,9 (718)	25,8 (62)	0,09
Entbindungsmodus [(n)]	(3384)	(1022)	(88)	0,42
Spontan [%]	11,5	12,2	8	n.sign.
Sectio [%]	81,8	81,8	88,6	n.sign.
Notsectio [%]	6,7	6,0	3,4	n.sign.
Apgar 5 Minuten*	8/2	8/1	8/1	n.sign.
Apgar 10 Minuten*	9/1	9/1	9/1	n.sign.
Nabelarterien pH*[(n)]	7,31/0,18 (3212)	7,31/0,24 (955)	7,31/0,1 (83)	n. sign.
Lungenreife vor Geburt [%] [(n)]	88 (3659)	88,6 (1096)	91,8 (97)	0,48
Tokolyse [%] [(n)]	49,4 (3652)	50 (1090)	55,1 (98)	0,52
Antenatale Antibiotika [%] [(n)]	45,7 (3639)	47,1 (1091)	49 (98)	0,6

**Tabelle 16:** Prä- und perinatale klinische Daten von VLBW Frühgeborenen stratifiziert nach rs4878404 Allelträgern: Fortsetzung

	CC (n=3675)	CA (n=1101)	AA (n=98)	p-Wert
<b>Ursache</b>				
<b>Frühgeburtlichkeit</b>				
Unhemmbare Wehen [%]	32	31,6	29,6	0,86
Amnioninfektionssyndrom [%]	20,7	20,4	22,4	0,89
HELLP [%]	10,2	9,3	10,9	0,76
Pathologisches CTG [%]	22,3	21,5	26,5	0,50
Wachstumsretardierung, pathologische Doppler [%]	25,5	23,5	15,6	0,12
Plazentalösung [%]	6,9	7,9	8,2	0,50

\* Mittelwert / Standardabweichung; Mann-Whitney-U Test für Geburtsgewicht, Gestationsalter, Apgar und NapH. Fisher's exact Test für weitere Daten. n.sign.: nicht signifikant

## 7.3 LINGO2

**Tabelle 17:** VLBW Frühgeborenen Daten stratifiziert nach rs10491678 Allelträgern

	CC (n=376)	TC (n=1312)	TT (n=1311)	p-Wert
Surfactant [%]	59,6	58,2	61,6	0,2
O2 Bedarf maximal innerhalb 12h [%]	39 (n=352)	39 (n=1273)	39 (n=1263)	n.sign.
Anzahl Surfactantgaben*	1,67/1,09 (n=221)	1,56/1,03 (n=756)	1,57/1,07 (n=803)	n.sign.
LISA Verfahren [%]	22,1	22,1	24,7	0,25
Tracheale Beatmung [%]	48,3 (n=373)	50 (n=1306)	49,3 (n=1306)	0,83
Beatmungstage total*	8,1/16,9 (n=372)	6,7/16,5 (n=1299)	7/16,3 (n=1297)	n.sign.
Pneumothorax [%]	4,8 (n=375)	5 (n=1309)	4,9 (n=1307)	0,98
Ende O2-Bedarf* (Gest.alter)	33,2 (n=288)	32,6 (n=1023)	32,7 (n=1043)	n.sign.
BPD [%]	17,3	16,2	15,8	0,78
Tod [%]	4,8	4	3,5	0,5
Gesamt IQ* [n]	99/13 (n=93)	96/16 (n=313)	96/17 (n=327)	n.sign.
Cerebralparese [%]	5,2 (n=97)	5,2 (n=324)	7,4 (n=337)	0,46
FEV1* [%]	86,5/16,5 (n=81)	86,2/16,0 (n=291)	85,5/15,6 (n=297)	n.sign.
FEV1/FVC*	1,1/0,1 (n=81)	1,1/0,1 (n=287)	1,1/0,1 (n=297)	n.sign.
FEV1<80% [%]	29,6 (n=24)	34,7 (n=101)	38 (n=113)	0,35

\* Mittelwert / Standardabweichung; Mann-Whitney-U Test für Beatmungstage, Ende O2-Bedarf, Gesamt-IQ, FEV1/FVC und Anzahl Surfactantgaben; Fisher's exact Test für weitere Daten. n. sign.: nicht signifikant

**Tabelle 18:** VLBW Frühgeborenen Daten stratifiziert nach rs10968574 Allelträgern

	CC (n=17)	TC (n=494)	TT (n=2488)	p-Wert
Surfactant [%]	94 (n=16)	57,7 (n=285)	60,1 (n=1494)	0,009
O2 Bedarf maximal innerhalb 12h [%]	39 (n=17)	38 (n=472)	39 (n=2399)	0,8
Anzahl Surfactantgaben*	1,44/0,81 (n=16)	1,58/1,04 (n=284)	1,58/1,06 (n=1480)	n.sign.
LISA Verfahren [%]	41,2	25,7	22,6	0,07
Tracheale Beatmung [%]	76,5	47	49,8	0,04
Beatmungstage total*	11,4/14 (n=17)	6,6/14,7 (n=491)	7,1/16,8 (n=2460)	n.sign.
Pneumothorax [%]	5,9	5,5	4,8	0,82
Ende O2-Bedarf* (Gest.alter)	33,8 (n=14)	32,8 (n=395)	32,7 (n=1945)	n.sign.
BPD [%]	29,4	16,8	16	0,29
Tod [%]	11,8	4,9	3,7	0,11
Gesamt IQ* [n]	96/3 (n=3)	96/17 (n=126)	97/16 (n=604)	n.sign.
Cerebralparese [%]	0 (n=3)	16,1 (n=143)	16,2 (n=653)	0,8
FEV1* [%]	89,3/14 (n=3)	85,7/16,3 (n=126)	85,8/15,8 (n=540)	n.sign.
FEV1/FVC*	1,1/0,1 (n=3)	1,1/0,1 (n=125)	1,1/0,1 (n=537)	n.sign.
FEV1<80% [%]	33,3 (n=3)	34,1 (n=126)	35,9 (n=540)	0,92

\* Mittelwert / Standardabweichung; Mann-Whitney-U Test für Beatmungstage, Ende O2-Bedarf, Gesamt-IQ, FEV1/FVC und Anzahl Surfactantgaben; Fisher's exact Test für weitere Daten. n. sign.: nicht signifikant

**Tabelle 19:** VLBW Frühgeborenen Daten stratifiziert nach rs10813121 Allelträgern

	AA (n=344)	GA (n=1297)	GG (n=1357)	p-Wert
Surfactant [%]	59,3	58,2	61,6	0,2
O2 Bedarf maximal innerhalb 12h [%]	39 (n=322)	39 (n=1257)	39 (n=1309)	0,8
Anzahl Surfactantgaben*	1,71/1,13 (n=201)	1,54/1,03 (n=748)	1,58/1,06 (n=831)	n.sign.
LISA Verfahren [%]	21,8	22,2	24,6	0,3
Tracheale Beatmung [%]	49	49,5	49,6	1,0
Beatmungstage total*	8,2/16,8 (n=340)	6,7/16,7 (n=1285)	7,0/16,2 (n=1343)	n.sign.
Pneumothorax [%]	5,0	5,0	4,9	1,0
Ende O2-Bedarf* (Gest.alter)	33,2 (n=261)	32,6 (n=1016)	32,8 (n=1077)	n.sign.
BPD [%]	17,7	16,2	15,8	0,7
Tod [%]	5,2	4,1	3,4	0,3

\* Mittelwert / Standardabweichung; Mann-Whitney-U Test für Beatmungstage, Ende O2-Bedarf und Anzahl Surfactantgaben; Fisher's exact Test für weitere Daten. n. sign.: nicht signifikant

**Tabelle 20:** VLBW Frühgeborenen Daten stratifiziert nach rs683471 Allelträgern

	AA (n=1323)	AG (n=1315)	GG (n=360)	p-Wert
Surfactant [%]	61,7	58,3	58,9	0,2
O2 Bedarf maximal innerhalb 12h [%]	39 (n=1274)	39 (n=1278)	39 (n=336)	0,9
Anzahl Surfactantgaben*	1,57/1,06 (n=811)	1,55/1,02 (n=760)	1,71/1,15 (n=209)	n.sign.
LISA Verfahren [%]	24,7	22,0	22,5	0,2
Tracheale Beatmung [%]	49,4	50	52,1	0,8
Beatmungstage total*	7,0/16,2 (n=1309)	6,7/16,6 (n=1303)	8,2/17 (n=356)	n.sign.
Pneumothorax [%]	4,9	4,9	5,1	0,9
Ende O2-Bedarf* (Gest.alter)	32,7 (n=1054)	32,7 (n=1026)	33,2 (n=274)	n.sign.
BPD [%]	15,5	16,5	17,5	0,6
Tod [%]	3,6	3,9	5,3	0,3

\* Mittelwert / Standardabweichung, Mann-Whitney-U Test für Beatmungstage, Ende O2-Bedarf und Anzahl Surfactantgaben; Fisher's exact Test für weitere Daten. n. sign.: nicht signifikant

## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Menschen danken, die das Entstehen der Arbeit ermöglicht haben.

Professor Dr. Egbert Herting danke ich sehr für die Möglichkeit an dem Institut der Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinik Lübeck promovieren zu dürfen.

Ich danke besonders meinem Doktorvater Professor Dr. Wolfgang Göpel, Abteilung Neonatologie, Universität Lübeck für die Vergabe des spannenden Themas und die exzellente klinische Ausbildung über Jahre. Die stetige Erreichbarkeit, Förderung, wissenschaftlichen Hilfestellungen, der immer bereichernde Ideenaustausch und Enthusiasmus für die Wissenschaft hat die Zeit in seiner Arbeitsgruppe für mich zu einem sehr wertvollen Teil meiner medizinischen Ausbildung gemacht.

Diese Arbeit ist nur durch die freiwillige Teilnahme der Familien Frühgeborener und zahlreicher Neonatologischer Kliniken und Institute möglich geworden. Ein namentlicher Dank wäre sicherlich unvollständig, ich danke allen sehr, dass sie dieses Projekt unterstützt haben. Mein weiterer Dank gilt allen Mitarbeitern/-innen des GNN Projektes. Dr. rer.nat. Michael Preuss für die Berechnung einer GWAS und die tolle Betreuung; Anja Sewe für ihre Unterstützung im Labor; Bea Hatje, die große Teile des GNN-Netzwerks koordiniert hat; Anja Kaufmann, Sabine Fischer und Sabine Brehm für das Datenbankmanagement. Außerdem danke ich Birgit Schröder und Petra Sperner, mit denen ich in dem Projekt der 5-Jahres-Nachuntersuchung viele interessante neue Einblicke in die langfristigen Folgen einer Frühgeburt gewinnen konnte. Des Weiteren danke ich unserem Kooperationspartner für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der GWAS, Prof. Nürnberg aus dem Cologne Center for Genomics der Universität Köln.

Das Gelingen dieser Arbeit haben die Menschen, die mich auf dem einen oder anderen liebevollen Wege in Vorbereitung und Fertigstellung begleitet und motiviert haben, ermöglicht. Ich danke sehr meiner ganzen lieben Familie und Freunden, besonders meinen Eltern, die meine schulische und universitäre Ausbildung immer gefördert haben und ganz besonders meinem Freund Johannes von Herzen.

Diese Promotion wurde in Teilen finanziert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung, BMBF 01ER0805 und BMBF 01ER1501.