

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

**Hypotension sehr kleiner Frühgeborener am ersten Lebenstag  
Eine Genomweite Assoziationsstudie**

Inauguraldissertation

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

vorgelegt von  
Hannah Esselborn  
aus Cuxhaven

Lübeck 2015

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

**Tag der mündlichen Prüfung: 26.4.16**

**Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 26.4.16**

**- Promotionskommission der Sektion Medizin -**

Meinen lieben Eltern gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 Einleitung</b> .....   | <b>7</b>  |
| 1.1 Frühgeborene .....  | 7         |
| 1.1.1 Hypotension bei Frühgeborenen.....  | 8         |
| 1.1.2 Antihypotensive Therapie bei Frühgeborenen .....  | 10        |
| 1.2 Fragestellung der Arbeit .....  | 12        |
| <b>2 Material und Methoden</b> .....  | <b>14</b> |
| 2.1 Die GNN-Studie.....   | 14        |
| 2.2 DNS-Isolierung .....  | 15        |
| 2.3 Ablauf einer Genomweiten Assoziationsstudie (GWAS).....                                     | 16        |
| 2.3.1 Qualitätskontrollen einer GWAS .....  | 18        |
| 2.3.2 Imputation .....  | 18        |
| 2.3.3 Analyse der GWAS und Auswertung der Ergebnisse .....                                      | 20        |
| 2.3.4 Genomweite Assoziation der GNN-Frühgeborenen zum Endpunkt<br>„Katecholamintherapie“ ..... | 20        |
| 2.4 GWAS3D .....  | 21        |
| 2.5 Replikation der SNPs .....  | 23        |
| 2.5.1 Replikation der SNPs der GWAS.....  | 25        |
| 2.5.2 Replikation von zwei SNPs aus der GWAS3D .....  | 27        |
| <b>3 Ergebnisse</b> .....   | <b>28</b> |
| 3.1 Studienkohorte .....  | 28        |
| 3.2 Ergebnisse der GWAS .....   | 29        |
| 3.3 Berechnung der Power.....   | 32        |
| 3.4 Intergenische Bereiche in GWAS3D .....  | 33        |
| 3.5 Ergebnisse der Replikation .....  | 36        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.6 Deskriptive Daten .....  | 38        |
| 3.6.1 Endpunkte „Blutdruck“ und „Katecholamintherapie“ .....   | 39        |
| 3.6.2 Endpunkte „Schwere Komplikationen“ und „Mortalität“ .....  | 40        |
| <b>4 Diskussion.....</b>   | <b>42</b> |
| 4.1 Blutdruckschwelle einer antihypotensiven Therapie .....  | 43        |
| 4.2 Besonderheiten der antihypotensiven Therapie bei Frühgeborenen .....                                     | 44        |
| 4.3 Ausstreichen der Nabelschnüre – mögliche Prävention der Hypotension ...                                  | 48        |
| 4.4 Frühgeborene und Hypertension im Erwachsenenalter .....  | 50        |
| 4.5 Schlussfolgerung und Ausblick .....  | 51        |
| <b>5 Zusammenfassung.....</b>  | <b>53</b> |
| <b>6 Literaturverzeichnis.....</b>   | <b>54</b> |
| <b>7 Anhang .....</b>  | <b>60</b> |
| 7.1 Anhang 1: Protokoll zur Isolierung von DNS aus Nabelschnur mit dem<br>Gentra® Puregene® Tissue Kit ..... | 60        |
| 7.2 Anhang 2: TaqMan® Prinzip .....  | 61        |
| 7.3 Anhang 3: Cluster Plot zur allelischen Diskriminierung .....   | 62        |
| 7.4 Anhang 4: Manhattanplots der GWAS zur Katecholamintherapie – weitere<br>Modelle .....                    | 63        |
| 7.5 Anhang 5: Deskriptive und klinische Daten in Abhängigkeit vom Genotyp..                                  | 65        |
| 7.6 Anhang 6: Häufigkeiten der Endpunkte Blutdruck und Katecholamintherapie<br>.....                         | 67        |
| <b>8 Danksagung .....</b>  | <b>68</b> |
| <b>9 Lebenslauf.....</b>   | <b>69</b> |

# Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| <b>Abbildung 1:</b> Manhattanplot der GWAS zur Katecholamintherapie – additives Modell.....   | 32 |
| <b>Abbildung 2:</b> Circleplot der GWAS3D für alle SNPs aus der GWAS zur Fragestellung „Katecholamintherapie – JA/NEIN“ (nach GWAS3D) ..... | 34 |
| <b>Abbildung 3:</b> Top SNPs der GWAS3D-Analyse (nach GWAS3D).....  | 35 |
| <b>Abbildung 4:</b> TaqMan® Prinzip.....  | 61 |
| <b>Abbildung 5:</b> Cluster Plot zur allelischen Diskriminierung.....   | 62 |
| <b>Abbildung 6:</b> Manhattanplot der GWAS zur Katecholamintherapie - dominantes Modell.....  | 63 |
| <b>Abbildung 7:</b> Manhattanplot der GWAS zur Katecholamintherapie - rezessives Modell.....  | 63 |
| <b>Abbildung 8:</b> Manhattanplot der GWAS zur Katecholamintherapie - heterozygoten Modell.....   | 64 |

## Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabelle 1:</b> PCR-Protokoll Reagenzien .....  | 26 |
| <b>Tabelle 2:</b> PCR-Protokoll Ablauf .....  | 27 |
| <b>Tabelle 3:</b> Klinische Daten der untersuchten Frühgeborenen.....   | 28 |
| <b>Tabelle 4:</b> Ergebnisse der GWAS .....   | 31 |
| <b>Tabelle 5:</b> Powerberechnung für die Replikation am additiven Modell .....   | 33 |
| <b>Tabelle 6:</b> Ergebnisse der Replikation der SNPs der GWAS.....   | 37 |
| <b>Tabelle 7:</b> Ergebnisse der Replikation der SNPS der GWAS3D .....  | 38 |
| <b>Tabelle 8:</b> Endpunkte Blutdruck und Katecholamintherapie am ersten Lebenstag<br>bei Frühgeborenen mit dem SNP rs6481071 .....                               | 40 |
| <b>Tabelle 9:</b> Schwere Komplikationen.....   | 41 |
| <b>Tabelle 10:</b> Mortalität .....   | 41 |
| <b>Tabelle 11:</b> Deskriptive Daten des Gesamtkollektivs in den verschiedenen<br>Genotypen .....   | 65 |
| <b>Tabelle 12:</b> Klinische Daten des Gesamtkollektivs in den verschiedenen<br>Genotypen .....   | 66 |
| <b>Tabelle 13:</b> Endpunkte Blutdruck und Katecholamintherapie am ersten Lebenstag<br>bei Frühgeborenen mit den SNPs rs12263698, rs6110241 und<br>rs6135128..... | 67 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                      |  |
|----------------------|--|
| APGAR                | Hautfarbe, Herzaktion, Absaugreflexe, Muskeltonus, Atmung        |
| BPD                  | Bronchopulmonale Dysplasie                                       |
| CBF                  | Zerebraler Blutfluss   |
| CEU                  | European American-Population                                     |
| CFTOE                | Cerebral Fractional Tissue Oxygen Extraction                     |
| CNV                  | Copy Number Variation  |
| CO <sub>2</sub>      | Kohlenstoffdioxid  |
| DBP                  | Diastolischer Blutdruck  |
| DNS                  | Desoxyribonukleinsäure   |
| ELBW                 | Extremely low birth weight (< 1.000 Gramm)                       |
| ENCODE               | Encyclopedia of DNA Elements                                     |
| FET                  | Fluoreszenz-Energietransfer                                      |
| FIP                  | Fokale Intestinale Perforation                                   |
| GA                   | Gestationsalter  |
| GNN                  | German Neonatal Network  |
| GWAS                 | Genomweite Assoziationsstudie                                    |
| HWE                  | Hardy-Weinberg-Equilibrium                                       |
| HZV                  | Herzzeitvolumen  |
| IVH                  | Intraventrikuläre Hämorrhagie                                    |
| KiGGS                | Studie zur Gesundheit von Kindern in Deutschland                 |
| LD                   | Linkage Disequilibrium   |
| MAF                  | Minor Allele Frequency   |
| MAKROD               | MAKRO Domain Containing  |
| MAP                  | Mittlerer Arterieller Druck (Pressure)                           |
| miF                  | Missing Frequency  |
| minMAP <sup>24</sup> | niedrigster mittlerer arterieller Druck in den ersten 24 Stunden |
| nCas                 | Anzahl der Fälle   |
| NCBI                 | National Center for Biotechnology Information                    |
| nCon                 | Anzahl der Kontrollen  |
| NEC                  | Nekrotisierende Enterokolitis                                    |
| NICU                 | Neonatal Intensive Care Unit                                     |

|      |  |
|------|--|
| NIH  | National Institutes of Health              |
| NIRS | Near Infrared Spectroscopy                 |
| NNT  | Number Needed To Treat                     |
| OR   | Odds Ratio                                 |
| PCA  | Principal Component Analysis               |
| PCR  | Polymerase Kettenreaktion (Chain Reaction) |
| PDA  | Persistierender Ductus Arteriosus          |
| PVL  | Periventrikuläre Leukomalazie              |
| rdP  | Reduced Odds Ratio In Percent              |
| ROP  | Retinopathia Praematurorum                 |
| SBP  | Systolischer Blutdruck                     |
| SDS  | Sequence Detecting System                  |
| SNP  | Single Nucleotide Polymorphism             |
| SSW  | Schwangerschaftswoche                      |
| SVC  | Superiorer Vena Cava Flow                  |
| VLBW | Very low birth weight (< 1.500 Gramm)      |
| Wo   | Wochen                                     |

# 1 Einleitung

## 1.1 Frühgeborene

Nach gängiger Definition der World Health Organization gelten Neugeborene dann als Frühgeborene, wenn sie vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche (SSW) bzw. früher als 259 Tage nach der letzten Menstruationsblutung zur Welt kommen. Dabei unterscheidet man zwischen extremely preterm (< 28 SSW), very preterm (28 bis < 32 SSW) und moderate bzw. late preterm (32 bis < 37 SSW) (Blencowe et al., 2012). Insgesamt gehen Blencowe et al. weltweit von einem geschätzten Wert von 14,9 Millionen Frühgeborenen im Jahr 2010 aus. Diese 11,1% aller Lebendgeburten weltweit stellen einen Mittelwert der verschiedenen Inzidenzen dar. Denn es gibt starke geographische Schwankungen. Während in Europa durchschnittlich 5,5-11,1% aller Lebendgeborenen zu früh geboren werden, beträgt dieser Anteil beispielweise in Afrika 18%. Entgegen der weit verbreiteten Ansicht einer starken Zunahme der Zahl der Frühgeborenen sind die Zahlen zumindest in Deutschland stabil. Im Zeitraum von 2004 bis 2008 lässt sich sogar ein leichter Rückgang von 9,2% auf 9% aller Lebendgeburten verzeichnen. Bei genauerem Betrachten der Kohorte der Frühgeborenen zeigt sich jedoch eine deutliche Inhomogenität. Insgesamt sind v.a. Mehrlinge von Frühgeburtslichkeit betroffen (2008: 64% der Mehrlinge), deren Zahl zunimmt. Im Jahr 2008 waren 3,4% aller Geburten in Deutschland Mehrlingsgeburten mit einem jährlichen Anstieg von 0,3% (Zeitlin et al., 2013). In den kommenden Jahren kann es demzufolge wieder zu einem Anstieg der Frühgeborenenrate kommen. Auffällig ist der Anstieg bei Frühgeborenen mit einem Gestationsalter (GA) < 28 SSW (Schleußner, 2013).

Gründe für den weltweiten Anstieg in den letzten 20 Jahren sind neben der steigenden Zahl an Mehrlingsgeburten die seit den 1980ern vermehrt zum Einsatz kommende Reproduktionsmedizin sowie das steigende Alter der Mütter (> 34. Lebensjahr) (Beck et al., 2010). Weitere Hauptrisikofaktoren der Frühgeburtslichkeit sind niedriger sozioökonomischer Status, ungesunder Lebensstil (Rauchen, Mangelernährung) sowie neben dem oben bereits aufgeführten mütterlichen Alter

über 34 Jahren ein Alter der Mutter unter 18 Jahren. Trotz großer Bemühungen liegt die Mortalität bei vor der 28. SSW geborenen Kindern noch bei 32% und bei nach der 32. SSW Geborenen ist die Mortalität mit 1,3% um das 10fache höher als bei Reifgeborenen. 77% der perinatalen Todesfälle entfallen daher auf die Gruppe der Frühgeborenen (Schleußner, 2013). Blencowe et al. führen Frühgeburtlichkeit als zweithäufigste direkte Todesursache in der Gruppe der Kinder unter dem 5. Lebensjahr an (Blencowe et al., 2012). Besonders schlecht ist das Outcome bei vor der 32. SSW Geborenen. Larroque et al. führen in ihrer aktuellen Veröffentlichung in dieser Gruppe eine Inzidenz der infantilen Zerebralpareesen von 5-10% an (Larroque et al., 2008). Zudem sind entsprechende Kinder prädisponiert, in ihrem späteren Leben chronische Krankheiten bei erhöhter Mortalität zu entwickeln (Boyle et al., 2012). Es wird außerdem ein gehäuftes Auftreten von sensorischen Defiziten, Lernschwäche und Atemwegserkrankungen beobachtet (Beck et al., 2010).

Frühgeborene stellen aus wissenschaftlicher Sicht eine interessante Studienpopulation dar, da sie als Extremgruppe besonders starke Effekte zeigen.

### 1.1.1 Hypotension bei Frühgeborenen

Unmittelbar nach der Geburt muss der kindliche Kreislauf viele Funktionen übernehmen, die bis dahin von der Mutter ausgeführt wurden. Beim Frühgeborenen sind das kardiale und das vaskuläre System jedoch noch nicht vollständig ausgereift. Folglich kommt es nicht selten zu hämodynamischen Problemen. Die vier häufigsten Defizite sind persistierende pulmonale Hypertonie, septischer Schock, kardiogener Schock (v.a. mit hypoxischer Ischämie) und niedriger Blutdruck (Barrington, 2013). Letzterer tritt bei bis zu einem Drittel der very low birth weight (VLBW) Frühgeborenen (d.h. Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht unter 1.500 Gramm) auf (Azhan und Wong, 2012). Kritisch ist dabei v.a. die Hypotension in den ersten 24 Stunden. In den folgenden Tagen normalisiert sich der Blutdruck meist (Logan et al., 2011).

Der Blutdruck ergibt sich aus dem Zusammenspiel von systemischem Blutfluss, kardialen Output und systemischem Gefäßwiderstand (Laughon et al., 2007). Der

Blutdruck galt lange als Standardindikator einer mangelhaften Organperfusion. Bei Neugeborenen ist es jedoch nicht einfach, Blutdruckgrenzen zu definieren, da die Normwerte für den Blutdruck unklar sind. Die Arbeitsgruppe um Ahn et al. definiert Hypotension für ihre Studie als einen mittleren arteriellen Blutdruck, der unter dem GA in Wochen liegt. Sie schlagen jedoch auch den Grenzwert von 30 mmHg vor (Ahn et al., 2012). Batton et al. fordern sogar, erst ab einem Blutdruck von 25 mmHg von Hypotension zu sprechen und bezeichnen einen Druck als hypotensiv, der unterhalb der 5. Perzentile für den Blutdruck liegt (Batton et al., 2013). An anderer Stelle findet man in der Definition der Hypotension als Bedingung eine zeitliche Dauer von mindestens 30 Minuten (Lightburn et al., 2013). Schwepcke et al. fordern neben den von Ahn et al. aufgestellten Bedingungen den Erhalt von Katecholaminen als Definitionskriterium (Schwepcke et al., 2013). In ihrer aktuellen Studie beobachteten Faust et al., dass der von ihnen gewählte minMAP<sup>24</sup>, definiert als niedrigster individueller mittlerer arterieller Druck (MAP) innerhalb der ersten 24 Stunden, bei VLBW-Kindern < 29 SSW Werte aufwies, die 1-2 mmHg unter dem GA in Wochen lagen (Faust et al., 2015). Die Definition der Hypotension, die sich am GA in Wochen orientiert, würde also bei mehr als 50% der Kinder unter einem GA von 29 SSW zur Diagnose einer arteriellen Hypotension führen.

Die Ursachen eines Hypotonus beim Frühgeborenen findet man im veränderten Kreislauf des Neugeborenen. Die Kombination aus Hypovolämie, myokardialer Dysfunktion, abnormer peripherer Vasoregulation sowie einer absoluten und relativen Insuffizienz der Nebenniere, die auf eine potentielle Downregulation der adrenergen Rezeptoren zurückzuführen ist, trägt zu einem vom gereiften System abweichenden Kreislauf bei (Noori und Seri, 2005). Risikofaktoren für einen niedrigen systolischen Blutfluss stellen ein niedriges GA, die Beatmung mit erhöhtem mittleren Druck, ein großer Durchmesser des Ductus arteriosus und eine schlechte myokardiale Kontraktilität dar (Osborn, 2005).

Systemische Hypoperfusion ist assoziiert mit erhöhter Mortalität, zerebrovaskulären Schäden und Störungen auf neuronaler Ebene. Bei betroffenen Frühgeborenen kann ein erhöhtes Auftreten von Intraventrikulärer Hämorrhagie (IVH), Periventrikulärer Leukomalazie (PVL), Nekrotisierender Enterokolitis (NEC) und Retinopathia Praematurorum (ROP) verzeichnet werden, wobei bisher keine

Rückschlüsse auf eine Kausalität gezogen werden konnten (Gagliardi, 2013). Kritisch ist v.a. die Endorganperfusion des Gehirns. Beim Frühgeborenen sind die Endgebiete der langen und kurzen penetrierenden Gefäße noch nicht ausreichend versorgt. Dies betrifft vorrangig die weiße Substanz, in der der zerebrale Blutfluss (CBF) folglich erniedrigt ist. In Kombination mit einer Autoregulationsstörung der zerebralen Gefäße ist die weiße Substanz bei bestehendem niedrigem Blutdruck besonders von Hypoxien betroffen (Azhan und Wong, 2012).

### 1.1.2 Antihypotensive Therapie bei Frühgeborenen

Die beschriebene Assoziation von Hypotension mit erhöhter Mortalität und neuronalen Schäden fordert eine perfusionsgewährleistende Therapie. Zunächst wird bei zu niedrigem Blutdruck oft eine Volumentherapie eingeleitet, um die Gabe von Inotropika als First-line-Therapie hinauszuzögern. Auch wenn keine Hypovolämie vorliegt, kann so der kardiale Output über den Frank-Starling-Mechanismus gesteigert werden (Azhan und Wong, 2012). Dabei kommen v.a. Kolloide und Kristalloide zum Einsatz. Allerdings diffundieren beide schnell aus dem Intravasalraum. Wie lange der Effekt andauert, ist unklar. In einem systematischen Review konnten Osborn und Evans kein verbessertes Langzeitoutcome durch eine Volumentherapie feststellen (Osborn und Evans, 2004). 16 bis 52% der Frühgeborenen mit Hypotension erhalten eine Volumentherapie, während bis zu 53% mit inotropen Medikamenten therapiert werden (Azhan und Wong, 2012).

Unter den Inotropika zählt Dopamin zu den am häufigsten verabreichten. Als Noradrenalin-Vorläufer bewirkt es sympathomimetisch über arterielle Vasokonstriktion und Erhöhung des Herzzeitvolumens (HZV) eine Blutdrucksteigerung. Es sollte mit einer kleinen Dosis begonnen und dann langsam auftitriert werden. 2,5 bis 20  $\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{min}^{-1}$  sind meist ausreichend. Dosen über 20  $\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{min}^{-1}$  sollten vermieden werden, da in diesem Fall die  $\alpha$ -vasokonstriktorische Komponente überwiegt, sodass das HZV sinkt (Azhan und Wong, 2012). Deshalb wird Dopamin oft als Vasopressor anstatt als Inotropikum bezeichnet (Cox und Groves, 2012). Nachteil dieses klassischen Vasopressors ist

jedoch eine pulmonal arterielle Drucksteigerung. In ihrer randomisierten kontrollierten Studie stellten Rios und Kaiser deshalb Vasopressin dem Dopamin in der Behandlung der Hypotension bei extremely low birth weight (ELBW) Frühgeborenen (d.h. Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht unter 1.000 Gramm) in den ersten 24 Stunden gegenüber. Vasopressin erwies sich dabei als gute Alternative. Zwischen den beiden Vasopressoren zeigte sich kein Unterschied im Effekt. Sowohl die Ansprechraten als auch die Zeit bis zum Erreichen eines adäquaten MAP ergaben keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Stattdessen war in der Gruppe der mit Vasopressin Behandelten ein geringerer mittlerer  $\text{CO}_2$ -Partialdruck messbar, der Surfactantbedarf war deutlich geringer und es traten keine Tachykardien unter der Gabe auf. Dies lässt sich mit dem pulmonal vasodilatatorischen bzw. dem fehlenden kardialen Effekt des Vasopressins erklären. Da dieser Studie jedoch nur eine kleine Fallzahl zugrunde lag, sollten vor dem Aussprechen allgemeiner Handlungsempfehlungen weitere Untersuchungen durchgeführt werden (Rios und Kaiser, 2015).

Dem Dopamin chemisch ähnlich ist das synthetische Isoprenalin-Analogon Dobutamin. Ebenfalls dosisabhängig wirkt es relativ selektiv auf  $\beta_1$ -Rezeptoren: in einer Dosis von 5 bis 10  $\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{min}^{-1}$  v.a. im linken Ventrikel und ab 10  $\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{min}^{-1}$  in der Vena cava superior (Azhan und Wong, 2012). Dobutamin hat sowohl einen positiv inotropen als auch einen vasodilatatorischen Effekt (Cox und Groves, 2012). Es ist nicht so wirksam wie Dopamin, hält jedoch den Auswurf des linken Ventrikels erfolgreicher aufrecht. Ab einem dopplergemessenen Superior Vena Cava Flow (SVC) von unter 41  $\text{ml}/\text{kg} \cdot \text{min}^{-1}$  schlagen Azhan und Wong den bevorzugten Einsatz von Dobutamin vor (Azhan und Wong, 2012).

Auch Adrenalin findet Anwendung in der antihypotensiven Therapie bei Frühgeborenen. Adrenalin bindet an  $\alpha_1$ -,  $\beta_1$ - sowie  $\beta_2$ -Rezeptoren. Es hat einen vergleichbaren Einfluss auf den Anstieg des systemischen MAP wie Dopamin und wirkt zudem noch intensiver positiv chronotrop. Jedoch kommt es unter der Adrenalintherapie über die Wirkung an den  $\beta_2$ -Rezeptoren zu transitorischen Anstiegen von Lactat, Blutzucker und Insulin, weshalb es in der Regel nur verwendet wird, wenn Dopamin und Dobutamin den Blutdruck nicht ausreichend

stabilisieren (Azhan und Wong, 2012). Zudem ist es am Frühgeborenen genauso wie Noradrenalin noch nicht ausreichend untersucht (Cox und Groves, 2012).

40% der Frühgeborenen reagieren nicht auf Inotropika (Osborn, 2005). Eine Erklärung bietet die Tatsache, dass unreife Kinder eine Nebennierenrindeninsuffizienz aufweisen und die kardiovaskulären adrenergen Rezeptoren downreguliert sind. In diesem Fall kommen Kortikosteroide zum Einsatz. Sie erhöhen kardiovaskulär die intrazelluläre Kalziumkonzentration, sodass infolgedessen die Kontraktilität der kardialen und vaskulären Muskelzellen steigt. Es resultiert ein Enhancement der adrenergen und dopaminergen Antwort auf die Katecholamine. Parallel zur Gabe von niedrigdosiertem Hydrokortison sollten die Vasopressoren jedoch in den folgenden 24 bis 72 Stunden in ihrer Dosis gesenkt werden. Im Gegensatz zu Dexamethason werden unter Hydrokortisongabe keine Störungen der zerebralen oder der sonstigen neurologischen Entwicklung beobachtet. Allerdings sollte es nicht zusammen mit Indomethacin verabreicht werden, da es darunter vermehrt zu intestinalen Perforationen kommen kann (Azhan und Wong, 2012).

Welches Therapieschema angewendet wird, divergiert stark zwischen den neonatalen Intensivstationen. Ob überhaupt eine Therapie bei niedrigen Blutdruckwerten eingeleitet wird, schwankt je nach behandelnder Intensivstation zwischen 29 und 98% (Ahn et al., 2012).

## 1.2 Fragestellung der Arbeit

Ausgangspunkt dieser Arbeit stellen die Ergebnisse von Faust et al. dar. Sie erkannten im Rahmen einer retrospektiven Kohortenstudie an 4.907 frühgeborenen VLBW-Kindern den minMAP<sup>24</sup> als unabhängigen Risikofaktor für IVH, Bronchopulmonale Dysplasie (BPD) und Mortalität (Faust et al., 2015). Diese Ergebnisse und das häufige Auftreten von Hypotension bei Frühgeborenen geben Anlass, nach den Ursachen zu forschen. Zum einen kann man auslösende Faktoren im Umfeld des Neugeborenen suchen. Uns interessierte jedoch, ob eine

genetische Komponente zu niedrigen Blutdruckwerten am ersten Lebenstag prädisponiert. Als Surrogatparameter für den Blutdruck fiel die Entscheidung zugunsten der „Katecholamintherapie“. Dieser Parameter ist zurzeit europaweit von großem Interesse. Auf der Suche nach protektiven Medikamenten zur Verhinderung von IVH u.a. Folgeerscheinungen der Hypotonie bei Frühgeborenen wurden große randomisierte kontrollierte Studien initiiert.

Unterteilt wurden die Frühgeborenen in zwei Gruppen: Katecholamintherapie „JA/NEIN“. Die beiden Gruppen wurden einander gegenübergestellt und mit Hilfe einer logistischen Regression mit Adjustierung nach dem GA auf Genomebene ausgewertet. Folgende Fragestellungen wurden beleuchtet:

- Gibt es eine genetische Komponente in der Entstehung von Hypotension bei Frühgeborenen am ersten Lebenstag?
- Können in einer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) genetische Faktoren gefunden werden, die mit der Katecholamintherapie assoziiert sind?
- Können die gefundenen Assoziationen in einer unabhängigen Kohorte repliziert werden?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Die GNN-Studie

Im Rahmen des „German Neonatal Network - Deutschen Frühgeborenen Netzwerks“ werden seit Januar 2009 deutschlandweit in 54 Kliniken prospektiv klinische Daten von Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1.500 Gramm erhoben. Einschlusskriterien sind neben dem niedrigen Geburtsgewicht ein  $GA \leq 36+6$  SSW. Ausgeschlossen werden aus einer anderen Kinderklinik verlegte Kinder.

Ziel der Studie ist es, genetische, klinische und soziale Faktoren zu identifizieren, die zur Entstehung bestimmter Krankheiten bei Frühgeborenen führen, um prophylaktisch handeln zu können. Dazu werden u.a. klinische Informationen über Sauerstoffbedarf, Applikation von Katecholaminen, Surfactant und Steroidhormonen sowie zum Auftreten von BPD, Sepsis und IVH gesammelt.

Die Daten werden zum einen direkt nach der Geburt sowie nach Entlassung bzw. Verlegung des Kindes von den behandelnden Neonatologen in den Studienzentren erhoben. Dabei werden präklinische Daten, therapeutische Interventionen und Vorkommnisse im Laufe des klinischen Aufenthaltes abgefragt. Mithilfe einer Schulung der dafür verantwortlichen Ärzte durch die Studienzentrale bei Einschluss in die Studie wird ein korrektes Ausfüllen sichergestellt. Zum anderen werden die Eltern gebeten sowohl während des stationären Aufenthaltes als auch ab dem ersten Lebensjahr im jährlichen Abstand bis zum vierten Lebensjahr sowie zur Fünfjahresuntersuchung den „KiGGS-Elternfragebogen“ auszufüllen. Dieser Fragebogen wurde bereits in der vom Robert-Koch-Institut durchgeführten KiGGS-Studie von Eltern von über 17.000 Kindern ausgefüllt. Er enthält Fragen zu sozialem Umfeld, Ernährung und Gesundheitsverhalten. Im Rahmen der KiGGS-Studie wurde eine repräsentative Stichprobe von reif geborenen Kindern im Alter von 0 bis 17 Jahren untersucht und mittels Fragebogen befragt. Diese 2007 publizierte Studie ermöglicht es uns, auf Vergleichsdaten und Messinstrumente zurückzugreifen.

Zudem werden die in die GNN-Studie eingeschlossenen Kinder im Alter von fünf Jahren durch Personal der Lübecker Studienzentrale nachuntersucht.

Zum Einschluss in die Studie muss der durch die Eltern ausgefüllte Einverständnisbogen vorliegen. Zuvor werden sie ausführlich mündlich und schriftlich über den Ablauf der Studie aufgeklärt.

Die in den Studienzentren erhobenen Daten werden in jährlichem Abstand von Mitarbeitern der Studienzentrale vor Ort anhand der Patientenakten überprüft. Auch von Frühgeborenen, die die Einschlusskriterien zwar erfüllen, aber nicht in die Studie eingeschlossen sind, werden anonymisiert ausgewählte Parameter erhoben und ausgewertet.

Zur Wahrung des Datenschutzes werden personenbezogene und klinische Daten in zwei Datenbanken getrennt voneinander gespeichert. Die klinischen Daten liegen pseudonymisiert vor. Eine Verknüpfung erfolgt lediglich über eine Identifikationsnummer. Die Eingabe wird computergestützt doppelt kontrolliert.

Zusätzlich werden der Studienzentrale nach der Geburt jeweils zwei Mundschleimhautabstriche vom Neugeborenen und seiner Mutter sowie ein kurzes Stück gefrorene Nabelschnur auf  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühlt zugesandt. Während die Fragebögen der Erfassung von präklinischen und klinischen Faktoren dienen, kann mit Hilfe der Abstriche und der Nabelschnur und der daraus isolierten Desoxyribonukleinsäure (DNS) die genetische Ebene untersucht werden.

Das Ethikvotum sowohl der Studienzentrale Universität zu Lübeck als auch der einzelnen teilnehmenden Kliniken liegt vor (Aktenzeichen der Ethikkommission Lübeck 08-022, Datum des Ethikvotums: 27.06.2008).

### 2.2 DNS-Isolierung

Grundsätzlich dienen die Nabelschnüre als bevorzugtes Probenmaterial, da die darin enthaltene DNS höher konzentriert vorlag. Nur bei fehlendem Nabelschnurrest wurde DNS aus dem Mundschleimhautabstrich isoliert. Allerdings war das Isolationsverfahren aus den Mundschleimhautabstrichen deutlich weniger zeitintensiv, sodass von Kindern, die in den Jahren 2012 und 2013 in die Studie eingeschlossen wurden, die DNS lediglich aus den Mundschleimhautabstrichen

isoliert wurde. Während die DNS aus den eingesandten Mundschleimhautabstrichen mittels QIAamp®DNA Mini Kit isoliert wurde, wurde zur Isolation aus den Nabelschnurproben Gentra® Puregene® Tissue Kit der Firma QIAGEN verwendet. Ersteres Verfahren beruhte auf einer Kieselsäure-Membran-Adsorption. Dafür wurden zunächst aus dem Abstrich-Tupfer mit Hilfe einer Protease die Proteine denaturiert. Durch Zugabe von Ethanol als Lösungsmittel wurde die erhaltene DNS in Lösung gebracht. Diese Lösung wurde dann wiederholt auf einen Filter, der sich in einem Zentrifugationsröhrchen befand, gegeben und zentrifugiert. Während das Filtrat verworfen wurde, blieb die DNS in den Filtern zurück. Es folgten mehrere Waschschriffe. Im Anschluss wurde die DNS aus den Filtern gelöst und in Lösung gebracht. Das Verfahren wurde auf die vom Hersteller empfohlene Art und Weise durchgeführt.

Die Isolierung der DNS aus den Nabelschnüren dagegen bestand aus mehreren Reinigungsschritten mit RNAse, Proteinase und einer Protein Precipitation Solution. Dabei kam es zur Ausfällung eines Protein-Pellets, das verworfen wurde. Zurück blieb die DNS, die in Isopropanolol ausgefällt wurde. Im Folgenden erfolgte ein Waschschriff mit Ethanol und nach Trocknung wurde die DNS durch Zugabe von DNS Hydration Solution in Lösung gebracht. Unser Protokoll folgte dabei nicht vollständig den Vorgaben der Firma QIAGEN (siehe Anhang 1).

Im Rahmen der DNS-Konzentrationsmessung wurde von der aus Nabelschnurproben isolierten DNS eine DNS-Konzentration von 50-70 ng/ $\mu$ l eingestellt. Bei der aus Mundschleimhautabstrichen isolierten DNS entfiel dieser Schriff, da hier nicht die Gefahr der zu hohen Konzentration bestand. Die isolierte DNS wurde später zum einen für die GWAS und zum anderen für die darauffolgende Replikation verwendet.

### 2.3 Ablauf einer Genomweiten Assoziationsstudie (GWAS)

Im Hinblick auf den Surrogatparameter „Katecholamintherapie“ konnten nun in GWAS gemeinsame genetische Varianten im gesamten menschlichen Genom untersucht werden. Gemeinsame genetische Varianten bzw. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) sind in der Bevölkerung etablierte Mutationen, die sich in der Substitution von einer Base unterscheiden. SNPs machen rund 90% der

Variationen im Genom aus (Edwards et al., 2013). Die National Institutes of Health (NIH) definieren die GWAS als eine Studie mit dem Ziel, genetische Assoziationen mit einem bestimmten Phänotyp aufzudecken (Ziegler und König, 2010). Dazu wird ohne vorbestehende a priori Hypothese in Bezug auf eine mögliche Lokalisation das gesamte menschliche Genom systematisch auf das Vorliegen von genetischen Assoziationen untersucht. GWAS beruhen auf zwei Annahmen: Man geht zum einen davon aus, dass der Großteil der Risikogene auf einer überschaubaren Anzahl von Krankheitsloci mit häufigen Varianten liegt. Zum anderen sind nach dem Konzept der indirekten Assoziation einzelne SNPs nicht direkt ursächlich für eine Krankheit. Vielmehr müssen sie nur in der Nähe funktioneller Varianten liegen. Dies wird durch das Phänomen des Linkage Disequilibrium bzw. Kopplungsungleichgewicht (LD) erklärt, das davon ausgeht, dass das Genom in Blöcke untergliedert ist, die mehrere Gene beinhalten bzw. größere Bereiche umfassen und über Kopplung überzufällig oft zusammen vererbt werden. Eine funktionelle Variante kann ein SNP sein, aber auch bei Inversionen, Insertionen, Deletionen oder Copy Number Variation (CNV) spricht man von einer funktionellen Variante.

In den letzten Jahren kam es zu einer starken Zunahme in der Anwendung von GWAS. Gründe hierfür waren die Einführung microarraybasierter Genotypisierungssysteme zu niedrigeren Preisen, Informationen aus dem HapMap-Projekt zur Auswahl von SNPs sowie eine große Zahl von Fall-Kontroll-Studien mit adäquater Power (Ziegler und König, 2010). Mittlerweile gilt es als Standardmethode, um die genetische Basis komplexer Krankheiten zu untersuchen (Heßler, 2013). Sie erlauben die Genotypisierung von mehr als einer Millionen SNPs im gleichzeitigen Vergleich tausender Proben. Voraussetzung für eine erfolgreiche Analyse ist eine ausreichende Dichte genetischer Marker, ein ausreichend hohes LD sowie eine hohe Probenzahl für eine suffiziente Power.

Nach Auswahl eines geeigneten DNS-Chips (kommerziell oder konzipiert) wird die isolierte DNS auf die Chips hybridisiert. Im Rahmen der Analyse erfolgt das Genotype Calling. Dabei werden nach einer Bildanalyse der Chips Intensitätsdaten generiert. Mithilfe von Algorithmen erfolgt dann eine Zuordnung der Genotypen zu den Individuen.

### 2.3.1 Qualitätskontrollen einer GWAS

Die darauffolgenden Qualitätskontrollen dienen durch Ausschluss falsch-positiver SNPs neben dem Erhalt valider Ergebnisse der Kostenreduktion in den Replikationsstudien. Sie beinhalten auf Probenebene die Frequenz fehlender Werte pro Probe, die Heterozygotenfrequenz, den Test auf kryptische Verwandtschaft (identity-by-descent) sowie eine Populationsstratifizierung mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA). Der gefundene SNP wird entsprechend auf die Frequenz fehlender Werte pro SNP (miF; Missing Frequency), das Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) und die Minor Allele Frequency (MAF) sowie die korrekte Strangkodierung untersucht (Ziegler und König, 2010). Je nach interner Weiterverarbeitung der Daten werden individuelle Kriterien ausgewählt. Ziel ist es, SNPs mit adäquater Qualität zu erhalten (Heßler, 2013).

In Bezug auf das Signifikanzniveau unterscheidet man zwei mögliche Fehler. Der  $\alpha$ -Fehler, auch Fehler 1. Art, beschreibt die fälschliche Entscheidung zugunsten der Alternativhypothese  $H_1$  (in unserem Fall, dass es keine genetische Komponente in der Entstehung von Hypotension bei Frühgeborenen am ersten Lebenstag gibt). Er entspricht dem gewählten Signifikanzniveau (hier das lokale Signifikanzniveau  $5 \cdot 10^{-8}$  für die Analyse der GWA). Wird die Entscheidung fälschlicherweise zugunsten der Nullhypothese  $H_0$  (es gibt eine genetische Komponente in der Entstehung von Hypotension bei Frühgeborenen am ersten Lebenstag) getroffen, liegt ein Fehler 2. Art ( $\beta$ -Fehler) vor. Aus diesem Wert ergibt sich die Power ( $=1 - \beta$ ), die im Rahmen der Qualitätskontrolle einer Studie berechnet wird. Sie gibt die statistische Trennschärfe an. Angestrebt wird eine Power von 80%, die als Idealmaß gilt. Die Power hängt zum einen von der Fallzahl und vom gewählten Alpha-Fehler ab. Je kleiner dieser gewählt ist, desto schwieriger ist es, eine hohe Power zu gewährleisten. Zum anderen spielen Effektstärke und Varianz der Verteilung in Fall- und Kontrollgruppe eine Rolle.

### 2.3.2 Imputation

Ein weit verbreiteter Weiterverarbeitungsschritt nach Erhalt der SNPs stellt die Imputation fehlender Genotypen dar (Howie et al., 2009). Die eigenen Daten

werden mit zusätzlichen Informationen angereichert. Dabei geht man davon aus, dass nicht genotypisierte SNPs aus benachbarten genotypisierten SNPs, mit denen sie im LD stehen, hergeleitet werden können. Theoretisch kann diese Nachbarschaft auf alle SNPs, die auf demselben Chromosom liegen, bezogen werden. Jedoch sinkt der Einfluss eines spezifischen SNPs mit steigender Distanz. Deshalb definiert man ein Fenster, in dem der genotypisierte SNP zur Anwendung kommt. Zunächst werden die Haplotypen der genotypisierten SNPs geschätzt. Unter Haplotypen versteht man die Allelkonfiguration der homologen Chromosomen für jede Person. Diese werden mit entsprechenden Haplotypen aus der Referenzdatenbank verglichen und die fehlenden Genotypen der GWAS, die mit den Haplotypen aus der Referenzdatenbank übereinstimmen, werden imputiert. Diese Art fehlende SNPs nachträglich einzufügen, kann genutzt werden, wenn sich in einer Qualitätskontrolle Genotypen bei einigen Probanden als nicht valide herausgestellt haben und die reduzierte Menge für signifikante Ergebnisse nicht ausreichend ist oder wenn mehrere SNPs die Qualitätskontrolle nicht bestanden haben. Es resultiert eine Feinkartierung der Chromosomen mit einer höheren Auflösung der Genloci. Dies schafft die Grundlage für weitere Analysen wie z.B. einer Metaanalyse.

Wichtig ist es, die bestehende Unsicherheit der Imputationsergebnisse mit einzubeziehen. Zu diesem Zweck bieten die meisten Imputationsmethoden Post-Wahrscheinlichkeiten für imputierte Genotypen. Zusätzlich sollten die imputierten Genotypen durch separate Genotypisierung der Probe bestätigt werden. Grundsätzlich ist der Erfolg der Imputation abhängig von der MAF, dem LD und der Anzahl fehlender SNPs. Ein stärkeres LD führt zu besseren Ergebnissen (moderates LD  $D' = 0,7$  ist ausreichend) und je weniger SNPs fehlen, desto höher ist die Genauigkeit. Zudem sollte die Referenzplatte adäquat auf die untersuchten Ethnien abgestimmt sein (Clarke et al., 2007).

Sowohl die direkt genotypisierten als auch die imputierten SNPs durchlaufen im Folgenden die „high level analysis“, die eine Replikation sowie ein Ableiten der Konsequenzen für die Bevölkerung beinhaltet.

### 2.3.3 Analyse der GWAS und Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse einer GWAS beginnt mit einer logistischen Regression. Sie dient der Ermittlung von p- und  $\beta$ -Werten, um aus Letzteren mittels  $e^{\beta} = \text{OR}$  die Odds Ratio (OR) zu berechnen. Ziel ist es, einen signifikanten Unterschied in der Verteilung der Genotypen zwischen Fällen und Kontrollen zu finden.

Jeder SNP wird separat auf eine Assoziation mit dem untersuchten Phänotyp getestet. Da die Untersuchung von mehreren Millionen SNPs bei tausenden Proben ein manuelles Vorgehen bei der Ergebnisauswertung jedes einzelnen SNPs ausschließt, bedient man sich einer Darstellung der Ergebnisse im Konfetti- bzw. Manhattan-Plot. Dieser präsentiert die p-Werte aller genotypisierten und imputierten SNPs auf einer logarithmischen Skala nach Chromosom- und Basenpaarposition geordnet. Durch diese Art der Darstellung erhält man einen schnellen Überblick über eventuell signifikante SNPs. Als Schwellenwert für die statistische Signifikanz würde das übliche globale Signifikanzniveau von 5% jedoch zu vielen falsch-positiven Ergebnissen führen. Deshalb ist eine Korrektur des multiplen Testens notwendig. Die Bonferroni-Korrektur ergibt bei einer Millionen analysierten SNPs und einem globalen Niveau von 0,05 ein lokales Signifikanzniveau von  $5 \cdot 10^{-8}$ . Werden in der GWAS noch mehr als diese eine Millionen SNPs untersucht, wird kein niedrigeres Signifikanzniveau angenommen. Vielmehr geht man aufgrund der bestehenden festen Anzahl der im LD stehenden Blöcke von einer natürlichen unteren Schwelle des Signifikanzniveaus aus. Aus der grafischen Darstellung im Manhattan-Plot kann eine Liste von „Top Hits“ mit den signifikanten SNPs, die die niedrigsten p-Werte aufweisen, erstellt werden. Diese werden im Folgenden dann repliziert.

### 2.3.4 Genomweite Assoziation der GNN-Frühgeborenen zum Endpunkt „Katecholamintherapie“

Zur Untersuchung wurden insgesamt 2.787 DNS-Proben sowohl von Betroffenen – in unserem Fall von Frühgeborenen, die eine Katecholamintherapie bekommen hatten – als auch von gesunden Frühgeborenen in das von Prof. Nürnberg geleitete Cologne Center for Genomics der Universität zu Köln verschickt. Um

Bias durch Duplikate bzw. kryptische Verwandtschaft zu vermeiden, wurde bei Mehrlingen jeweils nur ein Geschwisterkind eingeschlossen. Ein weiteres Ausschlusskriterium war eine nicht deutsche Herkunft, um Verzerrungen durch geografische und populationsspezifische Unterschiede im Genom zu minimieren. Nach weiteren Qualitätskontrollen, die u.a. die Bestimmung der Heterozygotenfrequenz sowie eine PCA umfassten, blieb eine Fallzahl von 2.257, die der GWAS zugeführt werden konnte.

Mehr als 570.000 SNPs wurden mit dem Axiom™ Genome-Wide CEU 1 Array genotypisiert und mittels Imputation auf ca. sieben Millionen SNPs angereichert. Da für ihren Nachweis nur kurze Fragmente repliziert werden mussten, war dies technisch sehr gut umsetzbar und auch für eine umfassende Untersuchung des gesamten Genoms bei vielen Proben geeignet. Unterschied sich die Kohorte mit der Merkmalsausprägung „Katecholamintherapie ist erfolgt“ in der Genotypverteilung eines bestimmten SNPs im Vergleich zur Kontrollgruppe, die keine Katecholamintherapie bekommen hatte, signifikant, war dieser SNP mit der Katecholamintherapie assoziiert. Eine Assoziation ließ keinerlei Rückschlüsse auf einen kausalen Zusammenhang zu, schloss ihn jedoch auch nicht aus.

Die Imputation erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Preuß aus dem Institut für medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck. Es kam das 1,000 Genomes – Phase I integrated variant set release (v3) in NCBI build 37 (hg19) coordinates zum Einsatz. Für die im Anschluss durchgeführte logistische Regression wurde SNPTTEST verwendet. Adjustiert wurde dabei mit dem GA.

### 2.4 GWAS3D

GWAS3D ist ein online verfügbares Programm, das mit Hilfe des GWAS3D-Algorithmus nicht codierende Varianten darstellt, die regulatorische Elemente beeinflussen können (Li et al., 2013). Es berechnet die Wahrscheinlichkeit für die genetische Variation regulatorischer Pfade sowie darauf basierender Krankheitsassoziationen. Ziel ist es, die wahrscheinlichsten Varianten zu finden, die Regulationsmechanismen beeinflussen. Der Schwerpunkt liegt auf den maßgeblichen Varianten (nach GWAS3D). Genetische Varianten in den regulatorischen Regionen wie Enhancern und Promotoren sind wichtig zum

Verständnis molekularer Mechanismen komplexer Zusammenhänge. Aktuelle Studien zeigten, dass in GWAS aufgedeckte genetische Varianten zu rund 88% außerhalb codierender Regionen liegen (Hindorff et al., 2009). Stattdessen liegen sie in den sogenannten intergenischen Regionen (Introns) (Edwards et al., 2013). Diese nicht codierenden genetischen Varianten sind deutlich schwerer zu interpretieren als die Protein-codierenden Varianten. Die Antwort auf die Frage nach der molekularen Funktion der genetischen Varianten in den nicht codierenden Regionen ist zurzeit von großem Interesse. Denn Fortschritte im Verständnis der genetischen Grundlagen können in der Entwicklung prognostischer, präventiver und therapeutischer Maßnahmen resultieren. Nicht codierende genetische Varianten sind in der Lage, viele biologische Aktivitäten zu beeinflussen: Transkription, Splicing, posttranskriptionale Regulation, Initiation bzw. Elongation der Translation sowie posttranslationale Modifikation. Es konnte wiederholt gezeigt werden, dass Mutationen in den distalen regulatorischen Elementen (z.B. Enhancern) zu Störungen in den Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren führten (Li et al., 2013). Die Entwicklung spezieller SNPs zur Untersuchung des Effekts genetischer Variationen auf die Bindungsaffinität ist ein neuer Ansatz in diesem Bereich (Teng et al., 2012).

Die Berechnung basierte auf den Ergebnissen der mit den GNN-Daten durchgeführten GWAS bzw. Listen von Varianten. Mit Hilfe von Daten über Chromatinbeschaffenheit, epigenetische Modifikationen, Sequenzmotive und konservative Informationen erfolgte eine Anreicherung der Daten. Ergänzend wurde auf genomweite Chromosomen-Interaktionsdaten zurückgegriffen. Die genetischen Varianten wurden mittels regulatorischer Regionen in Bezug auf das Referenzgenom kartiert. Daraufhin konnten Veränderungen der Bindungsaffinität in den regulatorischen Faktoren evaluiert werden. Dazu wurde auf die Map der Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) (The ENCODE Project Consortium, 2012) zurückgegriffen. Schließlich erfolgte die Kombination mit den originalen GWAS-Daten mit anschließender Priorisierung. Die Ergebnisse wurden mithilfe eines Circleplots anschaulich dargestellt. Da die Auswertung webbasiert ist, wird die Verwendung der aktuellsten Informationen gewährleistet (Li et al., 2013).

Die GWAS3D-Analyse bietet eine Möglichkeit, auf SNPs aufmerksam zu werden, die in der eigenen GWAS nicht zu den „Top Hits“ zählen, jedoch unter Umständen

unter Einbeziehung von Informationen über deren Interaktion mit regulatorischen Einheiten mit phänotypischem Outcome assoziiert sein können.

### 2.5 Replikation der SNPs

Um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen und das in der GWAS gefundene Ergebnis in einer anderen Kohorte zu bestätigen, wurden die im Rahmen der GWAS-Analyse des GNN-Projektes gefundenen SNPs in Lübeck repliziert. Dabei handelt es sich um ein einheitliches Vorgehen zur Bestätigung der gefundenen Ergebnisse einer Assoziation (Clarke et al., 2007). Unter Replikation versteht man die wiederholte Assoziation unter identischen Bedingungen in jedoch unabhängigen Proben (Clarke et al., 2007). Igl et al. betonen in ihrer Gegenüberstellung zur Methode der Validierung die Notwendigkeit, dass im Falle einer Replikation sowohl die Original- als auch die Bestätigungsprobe aus der gleichen Population stammen und das Studiendesign identisch sein muss. So können systematische Unterschiede auf ein Minimum reduziert werden und weiterhin bestehende Unterschiede lassen sich ausschließlich auf zufällige Fehler zurückführen. Letztere sinken mit zunehmender Probenzahl (Igl et al., 2009). Igl et al. begründen die Notwendigkeit einer Replikation mit dem „jackpot effect“ bzw. „winner's curse“. Diese beschreiben das Phänomen, dass auch im Falle wahrer Assoziation der Effekt der initialen Studie, die von der Assoziation berichtet, im Vergleich zum Effekt nachfolgender Studien überschätzt wird (Ziegler und König, 2010).

Die Replikation gefundener Assoziationen ist jedoch selten erfolgreich (Colhoun et al., 2003). Stattdessen werden meist nur abweichende Varianten gefunden. Oft wird es deshalb bereits als eine ausreichende Bestätigung gesehen, wenn die assoziierten SNPs im gleichen Gen bzw. in der Region des ursprünglich identifizierten Polymorphismus liegen. Daraus ergeben sich zwei mögliche Marker-Selektions-Strategien, die zurzeit beide zum Einsatz kommen. Im exakten Ansatz werden nur original signifikante Marker verwendet während im Ansatz der lokalen Annäherung auch in der Umgebung bindende Marker – sogenannte Proxy-SNPs - benutzt werden. Letzteres Verfahren ist nur in Regionen mit einem hohen LD zwischen den Markern möglich. Clarke et al. sprechen an dieser Stelle von einem

Hybrid-Design: ein mögliches Vorgehen, bei dem neben der exakten Replikation additiv eine lokale Replikation durchgeführt wird (Clarke et al., 2007). Als mögliche Ursachen für das häufige Scheitern der Bestätigung im Rahmen einer Replikation diskutieren Colhoun et al. u.a. eine variierende gemessene Assoziation zwischen den untersuchten Populationen. In diesem Zusammenhang führen sie jedoch an, dass bekannte Allele, die zu bestimmten Krankheiten führen, keine großen Variationen zwischen ähnlichen Populationen zeigen dürften, da die standardisierte Varianz der Allelfrequenz innerhalb von Subpopulationen der europäischen Verwandtschaft  $< 0,01$  beträgt. Dies ist auf die lange Halbwertszeit für verbreitete Krankheiten zurückzuführen: Seit langer Zeit haben fast alle Bevölkerungsgruppen einen im Groben gleichen Allelbestand. In Kohorten mit ähnlichem genetischen Hintergrund sowie ähnlichen Krankheitsraten ist eine Heterogenität folglich v.a. Gen-Umwelt-Interaktionen zuzuschreiben. Vielmehr sieht die Arbeitsgruppe Ursachen des Scheiterns im Studiendesign. Durch fehlende Power kommt es zu falsch-negativen Ergebnissen, während falsch-positive Ergebnisse zum einen zufällig entstehen und zum anderen oft nur signifikante Ergebnisse nach multiplen Testens publiziert werden und somit die Zahl potentieller assoziativer Loci drastisch reduziert wird. Diese Fehlerquellen sind jedoch korrigierbar (Colhoun et al., 2003). Ziegler und König sehen als mögliche Ursache dafür, dass sich eine Effektschätzung aus einer GWAS als schwierig erweist, die Tatsache, dass die entdeckten Allele nur Surrogate für kausale Varianten darstellen. Daraus resultiert, dass die Effekte der Assoziation nicht die direkten klinischen Effekte des genetischen Pfades widerspiegeln (Ziegler und König, 2010). Pei et al. beschreiben mit  $< 0,19\%$  einen nur kleinen Einfluss der genetischen Varianten auf die phänotypische Variation mit einer in der Folge fehlenden Heritabilität (Pei et al., 2014). Um dennoch kleine genetische Effekte aufdecken zu können, bietet die Kombination mit der Technik der Metaanalyse eine Lösung. Infolgedessen kommt es zu einem Anstieg der Power (Evangelou et al., 2007).

### 2.5.1 Replikation der SNPs der GWAS

Es fand eine Replikation der genetischen Marker mit allen in der GNN-Studie eingeschlossenen Frühgeborenen statt, wobei die Schnittmenge derjenigen Frühgeborenen, die bereits in der GWAS analysiert wurden, ausgeschlossen wurde, um eine unabhängige Kohorte zu bilden. Zusätzlich wurden die Kinder der Neo-Studie in die Kohorte mit eingeschlossen. Dabei handelt es sich um die GNN-Vorläuferstudie, die im Zeitraum von 2003 bis 2008 mit dem gleichen Studiendesign durchgeführt wurde. Der einzige Unterschied zwischen beiden Studien war das fehlende Follow-Up der Neo-Studie. Insgesamt ergab sich eine Probandenzahl von 7.534 Frühgeborenen für die Replikation.

Dazu wurde auf die bereits beschriebene isolierte DNS der Frühgeborenen zurückgegriffen, die zunächst nach Pipettierschema auf Mega Block 96 Well-Platten (Sarstedt, Nürnberg) und anschließend mit der Achtkanalpipette Eppendorf® Xplorer (Eppendorf® Hamburg) auf 384-PCR-Platten Vollrand (Sarstedt) pipettiert wurde. Jedes Well enthielt nun genau 5 ng DNS genau eines Kindes in luftgetrockneter Form. Von aus Nabelschnur isolierter DNS wurde 1  $\mu$ l (Konzentration 5 ng/ $\mu$ l) vorgelegt, während von der weniger konzentrierten DNS aus den Mundschleimhautabstrichen 2  $\mu$ l verwendet wurde. Zu dieser DNS wurden im Folgenden der TaqMan® Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), Ampuwa® Fresenius Kabi (Bad Homburg) sowie der farblich markierte SNP (Applied Biosystems) pipettiert (siehe Tabelle 1). Dafür wurde die Eppendorf® Multipette-stream mit Combitips advanced 0,1 ml sowie Eppendorf® reference Pipetten (Eppendorf® Hamburg) verwendet. Anschließend wurden die Platten mit Sealing Tape (optically clear, Sarstedt) luftdicht verschlossen, mittels Vortex gemischt (IKA® Vortex Genius 3) und zentrifugiert (Rotanta 46 RSC, Hettich Zentrifugen). Im TaqMan HT 7900 Applied Biosystems wurde dann die Polymerase Kettenreaktion (PCR) gestartet (siehe Tabelle 2). Dabei handelte es sich um eine fluoreszenzbasierte PCR (siehe Anhang 2, Abbildung 4). Der zur PCR verwendete SNP war dazu zum einen am 5'-Ende mit einem fluoreszenten Farbstoff, dem Reporter, und zum anderen am 3'-Ende mit einem Quencher (Rhodamin-Derivat) markiert. Als Reporter fungierten die Farbstoffe VIC und FAM (6-Carboxy-Fluorescein). Durch die räumliche Nähe konnte der Quencher mittels Fluoreszenz-Energietransfers (FET) das Fluoreszieren des Reporters

unterdrücken. Band jedoch der SNP bei passender Sequenz an die Proben-DNS, wurde der Quencher durch die Taq-DNA-Polymerase verdrängt, wenn diese im Rahmen der Extension des neuen Doppelstranges an die Bindungsstelle kam. Dabei bildete sich eine Y-förmige Sekundärstruktur, die die Exonukleasefunktion der Taq-Polymerase aktivierte. Durch die Hydrolyse des SNPs war die räumliche Nähe von Reporter und Quencher nicht mehr gegeben, der fluoreszenzunterdrückende FET des Quenchers entfiel und der am 5'-Ende des SNPs gebundene Reporter konnte durch eine entsprechende spezifische Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt werden (FAM 518 nm Emissionsfrequenz). Durch die Auswahl eines geeigneten Primer-Probenpaares, von dem der eine Primer an den Wildtyp und der andere an die Mutation band, war gewährleistet, dass das Fluoreszenzsignal bei homozygoten Merkmalsträgern nur bei einer Wellenlänge auftrat, während heterozygote Merkmalsträger Ausschläge in zwei Wellenlängenbereichen hatten. So ließ sich direkt ablesen, ob der untersuchte SNP bei einem Individuum vorlag.

Die allelische Diskriminierung mittels Cluster Plots erfolgte im TaqMan im Rahmen der Sequence Detecting System-Software (SDS). Es handelte sich folglich um eine Endpunktmessung nach Abschluss des PCR-Prozesses. Diese lief automatisiert ab, wurde jedoch manuell auf die Korrektheit der Negativkontrollen, die auf jeder Platte mitliefen, überprüft. Kam es hier zu starken Abweichungen, wurde ein weiterer Durchlauf gestartet. So wurde eine Kontamination, die zu falsch-positiven Werten führen konnte, ausgeschlossen (siehe Anhang 3, Abbildung 5).

**Tabelle 1:** PCR-Protokoll Reagenzien

| Reagenz                       | Hersteller / Firma | Menge in µl pro Probe   |
|-------------------------------|--------------------|-------------------------|
| Proben DNS                    |                    | verdünnt und getrocknet |
| Nabelschnur                   |                    | 1                       |
| Abstrich                      |                    | 2                       |
| TaqMan® Genotyping Master Mix | Applied Biosystems | 2,525                   |
| Ampuwa®                       | Fresenius Kabi     | 2,425                   |
| SNP                           | Applied Biosystems | 0,05                    |

**Tabelle 2:** PCR-Protokoll Ablauf

| <b>Gerät: TaqMan 7900</b>                       | <b>Nabelschnur</b>  | <b>Rachenabstrich</b> |
|---|---|-----------------------|
| <b>Probenvolumen (in µl)</b>                    | 6   | 7                     |
| <b>Zyklen</b> (Anzahl Repeats der Schritte 2+3) | 40  | 45                    |
| <b>Ablauf</b>                                   | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 95°C 10 Minuten Denaturierung</li> <li>2. 92°C 15 Sekunden Annealing</li> <li>3. 60°C 1 Minute Extension</li> </ol> |                       |

### 2.5.2 Replikation von zwei SNPs aus der GWAS3D

Entsprechend des oben aufgeführten Schemas der Replikation der in der GWAS gefundenen SNPs (siehe 2.5.1) wurden auch die beiden Top SNPs, die sowohl in der GWAS als auch in der GWAS3D besonders niedrige p-Werte aufgewiesen hatten (siehe 3.4), einer Replikation zugeführt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Studienkohorte

Im Zeitraum von 2009 bis 2014 erfüllten insgesamt 8.165 Kinder aus 54 verschiedenen Kliniken die Einschlusskriterien und wurden in die GNN-Studie eingeschlossen. Bei einem Großteil der Frühgeborenen stand ein Nabelschnurrest zur Verfügung. Bei 17,5% konnte man ausschließlich auf den Mundschleimhautabstrich zurückgreifen. Die GWAS erfolgte an 2.257 DNS-Proben. In die Replikation wurden neben insgesamt 4.812 Kindern aus der GNN-Studie zusätzlich die Kinder der Neo-Studie mit 2.722 VLBW-Kindern mit einbezogen, sodass eine Kohorte von 7.534 Kindern resultierte. Die Tabelle 3 zeigt die klinischen Daten der untersuchten Frühgeborenen. Die Mehrlingsrate ist bei den für die GWAS-Analyse ausgewählten Kindern deutlich niedriger, da in diesem Kollektiv von jeder Mehrlingsgruppe nur jeweils ein Kind untersucht wurde.

**Tabelle 3:** Klinische Daten der untersuchten Frühgeborenen

\* Angaben als Median (Perzentil 25 – Perzentil 75)

|                                     | <b>GWAS n=2257</b> | <b>Replikation n=7534</b> | <b>Total n=9791</b> |
|-------------------------------------|--------------------|---------------------------|---------------------|
| <b>Geburtsgewicht</b><br>[Gramm]*   | 1060 (810-1315)    | 1105 (840-1340)           | 1100 (840-1330)     |
| <b>Gestationsalter</b><br>[Wochen]* | 28,7 (26,7-30,6)   | 28,9 (26,9-30,7)          | 28,9 (26,7-30,7)    |
| <b>Mädchen [%]</b>                  | 47,1               | 49,8                      | 49,2                |
| <b>Mehrlinge [%]</b>                | 24,8               | 34,2                      | 32,0                |

## 3.2 Ergebnisse der GWAS

Im Rahmen der Genotypisierung in Köln und der anschließend in Lübeck erfolgten GWAS mit Imputation ergaben sich vier SNPs. Es handelt sich dabei um die SNPs rs12263698, rs6110241, rs6135128 und rs6481071 (siehe Tabelle 4 und Abbildung 1). Die SNPs rs12263698 und rs6110241 sind das Ergebnis der Imputation. Während die SNPs rs12263698 und rs6481071 in nahe benachbarten Regionen auf Chromosom 10 liegen, sind die beiden SNPs rs6110241 und rs6135128 auf Chromosom 20 zu finden. Der SNP rs12263698 liegt in der Intronregion NM.001142763.1 nahe des für *PCDH15* (Protocadherin-related 15) codierenden Gens. Dieses vermittelt  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Zell-Zell-Adhäsion und ist wichtig für retinale sowie cochleäre Funktionen. Veränderungen des Gens treten gehäuft beim Usher-Syndrom auf. Gleiches gilt für den anderen ebenfalls auf Chromosom 10 liegenden Polymorphismus. Die beiden SNPs auf Chromosom 20 liegen in der Intronregion von NM.080676.5, das für *MAKROD2* (MAKRO Domain Containing 2) codiert, welches u.a. im Verdacht steht mit Essstörungen und Demenz assoziiert zu sein. Keines der beschriebenen Gene in der Nähe der aufgeführten SNPs lässt einen Zusammenhang mit dem untersuchten Hypotonus bei VLBW-Kindern erkennen. Jedoch beinhaltet der intergenische Bereich viele Möglichkeiten der regulatorischen Einflussnahme auch auf weiter entfernt liegende Gene (siehe 2.4 GWAS3D) (dbSNP). Während die SNPs auf Chromosom 10 genomweite Signifikanz im additiven, heterozygoten und dominanten Modell aufweisen (siehe Abbildung 1 und Anhang 4, Abbildung 6 und 8), zeigen die beiden SNPs auf Chromosom 20 ausschließlich im heterozygoten Modell (siehe Anhang 4) eine Assoziation. Die verschiedenen genetischen Modelle lassen unterschiedliche Annahmen über die Vererbung zu. Das dominante Modell geht von einem erhöhten Risiko der Genotypen *Aa* aus. Dem rezessiven Modell liegt demgegenüber ein erhöhtes Risiko im Genotyp *aa* zugrunde. Grundsätzlich sollten alle genetischen Modelle berechnet werden, um die Teststärke zum Auffinden genetischer Assoziationen zu steigern.

Die Heterozygoten-OR spiegelt das Quotenverhältnis wider, d.h. die Ereignishäufigkeit in Relation zur komplementären Häufigkeit. Es berechnet sich mittels  $OR = \frac{p}{q}$ . Ein OR-Wert  $> 1$  drückt eine erhöhte Quote für das Eintreten des Ereignisses aus, während Werte  $< 1$  mit einer erniedrigten Quote für das Eintreten

des Phänotyps bei Vorliegen des entsprechenden Genotyps einhergehen. Liegt das OR zwischen dem oberen und unteren Grenzwert des Konfidenzintervalls mit einem Signifikanzniveau von  $\alpha$ , wird die Alternativhypothese verworfen. Die Tabelle 4 zeigt, dass dies für alle Genotypen der Fall ist.

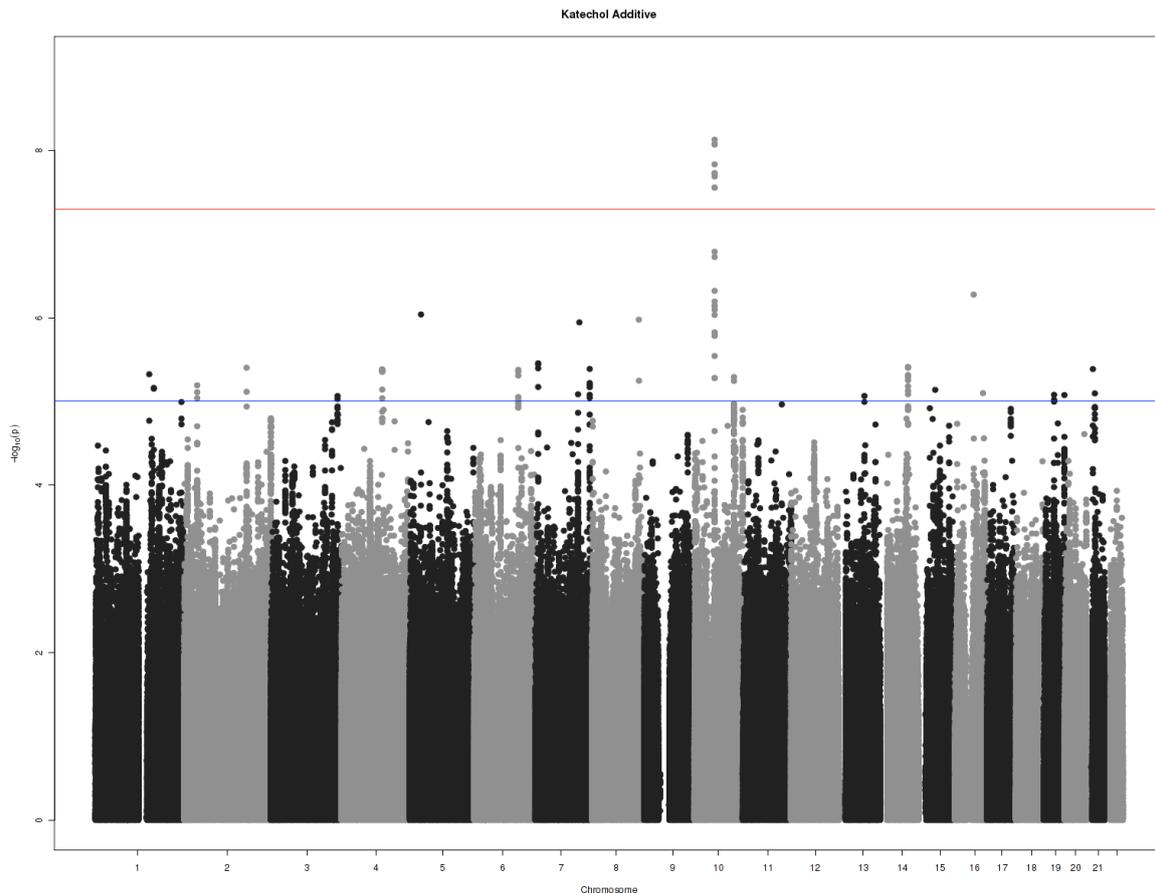
Die in Bezug auf die vorliegenden Daten durchgeführte Power-Analyse erreichte den angestrebten 80%-Wert nicht. Zwar basierte die klinische Studie auf einer ausreichend großen Kohorte, die Zahl der Fälle im Vergleich zu den Kontrollen war jedoch zu gering. Durch den Ausschluss nicht deutscher Kinder wurde die Fallzahl weiter eingeschränkt. Die geringe Fallzahl in unserer Stichprobe könnte Ursache eines Stichprobenfehlers sein. Dieser beschreibt das Abweichen von der wahren Häufigkeit. Das Vorliegen eines Fehlers 2. Art ist in diesem Fall nicht unwahrscheinlich. Durch Erhöhung der Fallzahl ist folglich auch eine Schlussfolgerung zugunsten der Alternativhypothese nicht ausgeschlossen.

**Tabelle 4:** Ergebnisse der GWAS

Gerundet auf ganze Zahlen bzw. auf vier Nachkommastellen. Bei den SNPs rs12263698 sowie rs6110241 handelt es sich um imputierte SNPs. Die anderen beiden aufgeführten SNPs sind genotypisiert. Ein p-Wert ab unter  $5 \cdot 10^{-5}$  gilt als genomweit verdächtig. Das genomweite Signifikanzniveau liegt bei  $5 \cdot 10^{-8}$ . Der SNP rs12263698 erreicht Signifikanz in drei genetischen Modellen.

*bp: Basenpaar, MAF: Minor Allele Frequency, HWE: Hardy-Weinberg-Equilibrium, OR (het): Heterozygoten-Odds Ratio, KI: Konfidenzintervall, add: additiv, dom: dominant, rez: rezessiv;*

| rsID                       | rs12263698  | rs6110241 | rs6135128 | rs6481071   |
|----------------------------|-------------|-----------|-----------|-------------|
| <b>Chromosom</b>           | 10          | 20        | 20        | 10          |
| <b>bp-Position</b>         | 56009056    | 14292454  | 14342719  | 55985865    |
| <b>Genotypen</b>           |             |           |           |             |
| <b>Allel A</b>             | A           | G         | G         | C           |
| <b>Allel B</b>             | G           | A         | A         | T           |
| <b>Genotypenverteilung</b> |             |           |           |             |
| <b>Fälle AA</b>            | 428         | 225       | 231       | 426         |
| <b>Fälle AB</b>            | 0           | 189       | 185       | 2           |
| <b>Fälle BB</b>            | 0           | 14        | 12        | 0           |
| <b>Kontrollen AA</b>       | 1750        | 1173      | 1183      | 1745        |
| <b>Kontrollen AB</b>       | 51          | 555       | 547       | 56          |
| <b>Kontrollen BB</b>       | 0           | 74        | 72        | 1           |
| <b>MAF Fälle</b>           | 0           | 0,2546    | 0,2442    | 0,0024      |
| <b>MAF Kontrollen</b>      | 0,0144      | 0,1952    | 0,1917    | 0,0161      |
| <b>HWE Kontrollen</b>      | 1           | 0,4985    | 0,4028    | 0,3726      |
| <b>OR (het)</b>            | -1          | 1,7783    | 1,7320    | 0,1463      |
| <b>OR (het) unteres KI</b> | -1          | 1,4297    | 1,3923    | 0,0356      |
| <b>OR (het) oberes KI</b>  | -1          | 2,212     | 2,1546    | 0,6019      |
| <b>p-Wert (add)</b>        | 7,46E-09    | 0,0008    | 0,0022    | 1,00E-04    |
| <b>p-Wert (dom)</b>        | 7,46E-09    | 1,02E-05  | 0         | 9,10E-05    |
| <b>p-Wert (rez)</b>        | NA          | 0,29      | 0,1608    | NA          |
| <b>p-Wert (het)</b>        | 7,46E-09    | 7,30E-07  | 1,75E-06  | 0,0001      |
| <b>Modell</b>              | add/dom/het | het       | het       | add/dom/het |



**Abbildung 1:** Manhattanplot der GWAS zur Katecholamintherapie – additives Modell.

Manhattan- bzw. Konfettiplot zur Darstellung der Stärke der genetischen Assoziation ( $-\log_{10}(p)$ ) auf der y-Achse gegen die Basenpaarposition pro Chromosom auf der x-Achse für das additive genetische Modell (für die anderen Modelle siehe Anhang 4). Jeder Punkt repräsentiert einen genotypisierten oder imputierten SNP. Niedrige p-Werte werden entsprechend hoch auf der y-Achse dargestellt. Die horizontale blaue Linie zeigt die genomweit verdächtige p-Wert Schwelle von  $5 \cdot 10^{-5}$ . Werte oberhalb der roten Linie ( $p < 5 \cdot 10^{-8}$ ) sind genomweit signifikant. Ausschließlich auf dem Chromosom 10 zeigt sich ein Locus mit genomweiter Signifikanz.

### 3.3 Berechnung der Power

In Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Preuß erfolgten Powerberechnungen. Es resultierte die Power bei Erreichen eines p-Wertes mit reduziertem OR (rdP). Die Reduktion spiegelt die Sensitivität der Power zum einen bei einer Einschränkung der Kohortengröße und zum anderen bei der Replikation, in der meist ein reduzierter Effekt zu registrieren ist, wider. Für alle Modelle wurde von folgenden Annahmen ausgegangen:  $\alpha = 0,005$ , rdP = c(0, 5, 10), Anzahl der Fälle (nCas) = 750, Anzahl der Kontrollen (nCon) = 3.400. Zwar ergibt die Berechnung Werte von

über 80%, jedoch ist von einer relativ hohen Zahl falsch-positiver Werte auszugehen. Durch Poolen der Daten, welches das Kombinieren dieser Ergebnisse mit den GWAS-Daten beinhaltet, resultieren ebenfalls keine genomweit signifikanten Ergebnisse. Folgende Tabelle gibt beispielhaft die Ergebnisse der Powerberechnung für das additive Modell wider.

**Tabelle 5:** Powerberechnung für die Replikation am additiven Modell

Powerwerte der SNPs in Abhängigkeit von verschiedenen Reduced OR In Percent (rdP). Werte auf vier Nachkommastellen gerundet. Der SNP rs12263698 hat keine Power, weil die Genotypverteilung bei den Fällen nur homozygot häufige Genotypen aufweist und deshalb die Berechnung nicht erfolgen konnte. Stattdessen wird auf den anderen SNP auf Chromosom 10 zurückgegriffen.

| rdP | rs12263698 | rs6110241 | rs6135128 | rs6481071 |
|-----|------------|-----------|-----------|-----------|
| 0   | NA         | 0,9943    | 0,9740    | >0,99     |
| 5   | NA         | 0,9814    | 0,9318    | >0,99     |
| 10  | NA         | 0,9459    | 0,8428    | >0,99     |

### 3.4 Intergenische Bereiche in GWAS3D

Auf der Grundlage der Ergebnisse der in Köln durchgeführten Genotypisierung wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Biometrie und Statistik eine GWAS3D-Analyse durchgeführt. Als Ausgangsmaterial dienten alle SNPs mit einem  $p < 5 \cdot 10^{-5}$ . Weitere Einstellungen, die auf der Seite des Web-Servers getätigt wurden, waren die Angaben „Analyse aller Zelllinien“ sowie Inklusion aller SNPs, die in einem LD mit  $r^2 \geq 0,8$  standen. Grundlage stellte die CEU (European American) Population dar. Es resultierten Ergebnisse in einer optisch übersichtlichen Darstellung als Circleplot (siehe Abbildung 2).



Darüber hinaus ermöglicht GWAS3D die Ansicht detaillierter Informationen (siehe Abbildung 3). Zwei SNPs wurden als SNPs mit besonders niedrigem p-Wert sowohl in unserer GWAS als auch in der GWAS3D-Analyse hervorgehoben. Dabei handelt es sich um die SNPs rs213561 und rs10137975.

| SNPID       | POS         | LOCUS   | (CP)     | LEADSNP     | ORIGP      | R <sup>2</sup> | STATUS |
|-------------|-------------|---------|----------|-------------|------------|----------------|--------|
| rs213561    | 14:78639213 | 14q24.3 | 2.68e-10 | rs213561    | 0.00000485 | 1              |        |
| rs10137975  | 14:78650561 | 14q24.3 | 3.14e-10 | rs10137975  | 0.00000389 | 1              |        |
| rs3823838   | 7:8166070   | ICA1    | 3.97e-9  | rs10952087  | 0.00000361 | 0.957          |        |
| rs115264971 | 4:113901136 | ANK2    | 4.51e-9  | rs115264971 | 0.00000415 | 1              |        |

**Abbildung 3:** Top SNPs der GWAS3D-Analyse (nach GWAS3D)

Die beiden orangefarben hinterlegten SNPs stellen die beiden SNPs dar, die sowohl in unserer GWAS als auch in der GWAS3D-Analyse niedrige p-Werte aufweisen. Ihr Status kennzeichnet sie u.a. farbcodiert als maßgebliche Variante mit signifikanter Transkriptionsfaktorbindungsstellenaffinität und einer Lokalisation in einer mutmaßlichen Enhancerregion. Der SNP rs213561 weist zudem eine Interaktion mit distalen Stellen auf.

### 3.5 Ergebnisse der Replikation

Für die Replikation der GWAS wurden, wie eingangs erwähnt, 7.534 Frühgeborene untersucht. Die Genotypisierung gelang für alle Polymorphismen in der großen Mehrzahl der untersuchten Kinder (rs12263698 94,7%, rs6110241 94,1%, rs6135128 86,6%, rs6481071 97,7%). Die klinischen Daten und Komplikationen in Abhängigkeit vom Genotyp sind im Anhang 5 in den Tabellen 11 und 12 dargestellt. Da für die Replikation der GWAS-Ergebnisse identische Auswahlkriterien angewandt wurden (d.h. es wurden nur Kinder deutscher Herkunft ausgewählt und von jeder Mehrlingsgruppe wurde zufällig ein Kind ausgewählt), ist die Zahl der in die Replikation eingegangenen Fälle deutlich geringer. Die genauen Fallzahlen sind in den Tabellen 6 und 7 zusammengefasst. Weder die in der GWAS gefundenen SNPs noch die beiden SNPs, die aus der GWAS3D-Analyse resultierten, konnten in der darauffolgenden Replikation bestätigt werden (siehe Tabelle 6 und 7). Keiner der sechs SNPs erreichte das Signifikanzniveau von 0,0125 (SNPs der GWAS) bzw. 0,0083 (SNPs der GWAS3D). Diese Signifikanzniveaus ergeben sich mittels Bonferroni-Korrektur aus dem globalen Signifikanzniveau  $\alpha$  korrigiert um die Anzahl der durchgeführten Tests. Diese lag bei vier Tests für die Replikation der vier SNPs der GWAS ( $0,05/4 = 0,0125$ ). Für die Replikation der beiden SNPs der GWAS3D betrug die Anzahl der Tests sechs. Denn diese beiden Tests erfolgten nach Abschluss der eigentlichen Replikation und wurden zu den vier Tests hinzugezählt, um für das multiple Testproblem erneut zu adjustieren. Hier zeigt sich die unter 2.5 bereits dargestellte Problematik des häufigen Scheiterns der Replikation.

**Tabelle 6:** Ergebnisse der Replikation der SNPs der GWAS

Werte gerundet auf vier Nachkommastellen. Keiner der Polymorphismen unterschreitet das Bonferroni-korrigierte Signifikanzniveau von 0,0125, d.h. die Polymorphismen können nicht bestätigt werden.

| rsID                       | rs12263698 | rs6110241 | rs6135128 | rs6481071 |
|----------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Allel A</b>             | A          | G         | G         | C         |
| <b>Allel B</b>             | G          | A         | A         | T         |
| <b>Fälle AA</b>            | 735        | 460       | 461       | 751       |
| <b>Fälle AB</b>            | 12         | 244       | 214       | 12        |
| <b>Fälle BB</b>            | 0          | 41        | 34        | 0         |
| <b>Kontrollen AA</b>       | 3283       | 2102      | 2052      | 3370      |
| <b>Kontrollen AB</b>       | 60         | 1100      | 940       | 73        |
| <b>Kontrollen BB</b>       | 1          | 108       | 95        | 1         |
| <b>MAF Fälle</b>           | 0,0080     | 0,2188    | 0,1989    | 0,0079    |
| <b>MAF Kontrollen</b>      | 0,0093     | 0,1988    | 0,1830    | 0,0109    |
| <b>HWE Kontrollen</b>      | 0,2483     | 0,0140    | 0,3357    | 0,3345    |
| <b>OR (het)</b>            | NA         | 0,5843    | 0,6361    | NA        |
| <b>OR (het) unteres KI</b> | NA         | 0,3974    | 0,4184    | NA        |
| <b>OR (het) oberes KI</b>  | NA         | 0,8590    | 0,9671    | NA        |
| <b>p-Wert (add)</b>        | 0,6861     | 0,1992    | 0,3190    | 0,3520    |
| <b>p-Wert (dom)</b>        | NA         | 0,0286    | 0,1065    | NA        |
| <b>p-Wert (rez)</b>        | 0,7541     | 0,5517    | 0,6092    | 0,3912    |
| <b>p-Wert (het)</b>        | 0,8323     | 0,7393    | 0,8762    | 0,4443    |

**Tabelle 7:** Ergebnisse der Replikation der SNPS der GWAS3D

Werte gerundet auf vier Nachkommastellen. Keiner der Polymorphismen unterschreitet das Bonferroni-korrigierte Signifikanzniveau von 0,0083, d.h. die Polymorphismen können nicht bestätigt werden.

| rsID                       | rs10137975 | rs213561 |
|----------------------------|------------|----------|
| <b>Allel A</b>             | G          | G        |
| <b>Allel B</b>             | A          | C        |
| <b>Fälle AA</b>            | 9          | 2        |
| <b>Fälle AB</b>            | 140        | 52       |
| <b>Fälle BB</b>            | 560        | 173      |
| <b>Kontrollen AA</b>       | 46         | 22       |
| <b>Kontrollen AB</b>       | 718        | 261      |
| <b>Kontrollen BB</b>       | 2790       | 941      |
| <b>MAF Fälle</b>           | 0,1114     | 0,1233   |
| <b>MAF Kontrollen</b>      | 0,1140     | 0,1246   |
| <b>HWE Kontrollen</b>      | 1          | 0,4311   |
| <b>OR (het)</b>            | 0,9966     | 219,157  |
| <b>OR (het) unteres KI</b> | 0,4769     | 0,5      |
| <b>OR (het) oberes KI</b>  | 208,251    | 960,669  |
| <b>p-Wert (add)</b>        | 0,6871     | 0,888    |
| <b>p-Wert (dom)</b>        | 0,9884     | 0,5469   |
| <b>p-Wert (rez)</b>        | 0,6576     | 0,9973   |
| <b>p-Wert (het)</b>        | 0,6474     | 0,8702   |

### 3.6 Deskriptive Daten

Im Folgenden wurden in der im Rahmen der GNN- und der Neo-Studie untersuchten Kohorte ausgewählte klinische Endpunkte in Abhängigkeit von den vier verschiedenen Genotypen der GWAS untersucht. Zur Testung auf Unabhängigkeit kam der Chi-Quadrat-Test nach Pearson zur Anwendung, der im Falle von Signifikanz ( $\alpha \leq 0,05$ ) einen Unterschied zwischen den Gruppen anzeigt.

### 3.6.1 Endpunkte „Blutdruck“ und „Katecholamintherapie“

Folgende Tabelle (siehe Tabelle 8) zeigt den MAP am ersten Lebenstag sowie die daraus resultierende Katecholamingabe bei Frühgeborenen mit dem SNP rs6481071 getrennt in den verschiedenen Genotypen. Die Darstellung ist an dieser Stelle auf den Polymorphismus beschränkt, da dieser als einziger signifikante Unterschiede in den einzelnen Genotypen aufweist (für die anderen SNPs siehe Anhang 6, Tabelle 13). Dass der Median des MAP bei den homozygot Seltenen (CC) deutlich unter dem der anderen beiden Genotypen liegt, hängt vermutlich mit der geringen Fallzahl in dieser Gruppe zusammen. Diese erklärt auch die großen Schwankungen in den Perzentilen 25 und 75.

Da sich die verschiedenen Katecholamine, die für unsere Analyse kollektiv unter dem Begriff „Katecholamine“ geführt wurden, in ihren Wirkeigenschaften unterscheiden, wurde das Ergebnis getrennt nach den Wirkmechanismen aufgeschlüsselt, um eine eventuelle Verzerrung auszuschließen. Während Adrenalin, Dopamin und Noradrenalin eine erhöhte Affinität zu den  $\alpha$ -Rezeptoren aufweisen, wirkt Dobutamin relativ spezifisch auf die  $\beta_1$ -Rezeptoren.

Vergleicht man den allgemeinen Einsatz der Katecholamine in den drei Phänotypen, sind die Schwankungen minimal. Betrachtet man die verschiedenen Katecholamine jedoch differenziert, ergeben sich signifikante Abweichungen, da zwei der elf Kinder mit homozygotem CC-Genotyp extrem niedrige MAP-Werte am ersten Lebenstag aufwiesen und mit allen vier Katecholaminen behandelt wurden, während von den Frühgeborenen mit den Genotypen homozygot häufig (TT) sowie heterozygot (TC) jeweils ein ähnlich großer Anteil eine Therapie mit Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin bzw. Dobutamin erhielt. Dieses Resultat sollte jedoch in Anbetracht der geringen Fallzahl des homozygot seltenen Genotyps unter Vorbehalt gesehen werden.

**Tabelle 8:** Endpunkte Blutdruck und Katecholamintherapie am ersten Lebenstag bei Frühgeborenen mit dem SNP rs6481071

Dargestellt sind der Median und die Perzentile des mittleren arteriellen Drucks (MAP) sowie der Katecholamintherapie in Abhängigkeit von den verschiedenen Genotypausprägungen bei Frühgeborenen mit dem Polymorphismus rs6481071. Der Median des MAP bei Kindern mit dem Genotyp CC liegt deutlich unter dem der anderen beiden Genotypen. Entsprechend kommt es bei diesen Kindern vermehrt zum Einsatz von Katecholaminen. Man beachte die geringe Fallzahl in dieser Gruppe. Die Gesamt-Fallzahlen zum Endpunkt MAP sind niedriger, da der Blutdruck in der Neo-Studie nicht routinemäßig dokumentiert wurde.

| <b>Genotyp</b>                                   |                          | <b>TT</b>                | <b>TC</b>             | <b>CC</b>          |
|--|--------------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------|
| <b>MAP minimal am ersten Lebenstag</b><br>[mmHg] | Median                   | 28                       | 27                    | 24                 |
|  | Perzentil 25             | 23                       | 22                    | 20                 |
|  | Perzentil 75             | 32                       | 31                    | 36                 |
|  | Anzahl der Frühgeborenen | 4797                     | 180                   | 9                  |
| <b>Katecholamine</b> [n/n (%)]                   |                          | 1420 /<br>7685<br>(18,5) | 50 /<br>256<br>(19,5) | 2 /<br>9<br>(18,2) |
|  | <b>Dopamin</b> [%]       | 10,8                     | 11,9                  | 18,2               |
|  | <b>Adrenalin</b> [%]     | 4,7                      | 4,7                   | 18,2               |
| <b>Noradrenalin</b> [%]                          |                          | 3,8                      | 5,8                   | 18,2               |
| <b>Dobutamin</b> [%]                             |                          | 10,0                     | 10,9                  | 18,2               |

### 3.6.2 Endpunkte „Schwere Komplikationen“ und „Mortalität“

Wie die folgende Tabelle (siehe Tabelle 9) zeigt, ist der Endpunkt „schwere Komplikationen“, der das Auftreten von IVH Grad III oder IV, PVL, OP wegen NEC, Fokale Intestinale Perforation (FIP) bzw. ROP und Tod umfasst, in den Trägern der von uns untersuchten Genotypen nicht signifikant vermehrt bzw. vermindert aufgetreten. Demgegenüber erreichte der Endpunkt „Tod“ in der deskriptiven Statistik Signifikanz in den SNPs rs6110241 sowie rs6135128 (siehe Tabelle 10). Da der Endpunkt „Tod“ als sehr relevanter Outcome-Parameter bei Trägern dieser Polymorphismen signifikant verändert ist, bieten sich an dieser Stelle weitere Untersuchung an.

**Tabelle 9:** Schwere Komplikationen

Betrachtet man den Endpunkt schwere Komplikationen in den vier verschiedenen Genotypen unter Annahme eines Signifikanzniveaus von 0,05, erreichen die deskriptiven p-Werte im durchgeführten Chi-Quadrat-Test nach Pearson das Signifikanzniveau nicht.

*\*IVH III/IV, PVL, OP wegen NEC, FIP, ROP*

|  | rs12263698 | rs6110241 | rs6135128 | rs6481071 |
|--|------------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Allel A</b>                               | A          | G         | G         | C         |
| <b>Allel B</b>                               | G          | A         | A         | T         |
| <b>Fälle AA</b>                              | 946        | 619       | 606       | 972       |
| <b>Fälle AB</b>                              | 34         | 313       | 275       | 40        |
| <b>Fälle BB</b>                              | 3          | 40        | 36        | 3         |
| <b>Kontrollen AA</b>                         | 5929       | 3851      | 3714      | 6083      |
| <b>Kontrollen AB</b>                         | 160        | 1968      | 1638      | 195       |
| <b>Kontrollen BB</b>                         | 5          | 241       | 207       | 8         |
| <b>Schwere Komplikation* oder Tod</b> p-Wert | 0,051      | 0,970     | 0,895     | 0,162     |

**Tabelle 10:** Mortalität

Im Hinblick auf den Endpunkt Tod liegen bei Kindern mit den Polymorphismen rs6110241 sowie rs6135128 signifikante p-Werte vor.

|                               | rs12263698 | rs6110241 | rs6135128 | rs6481071 |
|-------------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Allel A</b>                | A          | G         | G         | C         |
| <b>Allel B</b>                | G          | A         | A         | T         |
| <b>Fälle AA</b>               | 210        | 125       | 130       | 212       |
| <b>Fälle AB</b>               | 7          | 73        | 69        | 12        |
| <b>Fälle BB</b>               | 0          | 15        | 14        | 0         |
| <b>Kontrollen AA</b>          | 6663       | 4345      | 4190      | 6841      |
| <b>Kontrollen AB</b>          | 187        | 2206      | 1842      | 223       |
| <b>Kontrollen BB</b>          | 8          | 266       | 229       | 11        |
| <b>Tod (stationär)</b> p-Wert | 0,800      | 0,046     | 0,042     | 0,156     |

## 4 Diskussion

Im Gegensatz zu Ansätzen wie dem klinischen Outcome sowie der Behandlung der Hypotension Frühgeborener am ersten Lebenstag, die bereits in zahlreichen Studien thematisiert wurden, ist der genetische Einfluss auf die Hypotension bisher nur wenig untersucht worden. Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Fall-Kontroll-Studie, in der Frühgeborene mit bzw. ohne erfolgter Katecholamintherapie retrospektiv vergleichend auf das Vorhandensein damit assoziierter Gene untersucht wurden. Sie zeichnet sich durch eine große Teilnehmerzahl von rund 8.000 genotypisierten Kindern aus. Hier liegt eine der Stärken der Studie. Auch besteht eine hohe Datenqualität. Die GNN-Studie stellt eine wichtige Grundlage für genetische und pharmakogenetische Studien an sehr kleinen Frühgeborenen dar.

Zwar resultierten aus der Analyse der an 2.257 Kindern durchgeführten GWAS signifikante Polymorphismen, die möglicherweise mit der Verabreichung einer Katecholamintherapie assoziiert sind. Diese konnten jedoch in der nachfolgend durchgeführten Replikation nicht bestätigt werden.

Im Rahmen des Qualitätsmanagements der Studie sind verschiedene Störfaktoren in Betracht zu ziehen. Diese können ursächlich für die fehlende statistische Signifikanz sein. Eine mögliche Verzerrung stellt die Beobachtersvariabilität dar. Diese ergibt sich beispielweise durch den Schichtwechsel und eine generelle Beteiligung mehrerer PflegerInnen an der Blutdruckmessung, die die Basis für die Entscheidung zur Katecholamintherapie darstellte. Diese Verzerrung bestand in verstärkter Form zwischen den verschiedenen teilnehmenden Neonatal Intensive Care Units (NICUs), deren diagnostische und therapeutische Konzepte z.T. stark voneinander abwichen. Darüber hinaus waren weitere Schwächen in der Generierung der Blutdruckdaten zu finden: Dadurch, dass stabile Kinder nur intermittierend gemessen wurden, bestand die Gefahr, hypotensive Episoden zu übersehen. Zudem war die Dokumentation der Messwerte in dieser Patientengruppe lückenhafter. Die Dokumentation des jeweils besseren Wertes bei stabilen Kindern im Gegensatz zur bevorzugten Dokumentation des jeweils niedrigeren Wertes bei kränkeren Kindern könnte ebenfalls zu einer Verzerrung

beigetragen haben. Des Weiteren wurden keine Aufzeichnungen zur jeweiligen Dauer hypotensiver Episoden gemacht (Faust et al., 2015). Bedingt durch das vorliegende Studiendesign einer reinen Beobachtungsstudie ist jedoch eine aktive Zuordnung nach Expositionsbedingungen nicht möglich. Nur durch generell einheitliche Richtlinien kann man diese Form der systematischen Fehler begrenzen.

Weitere Fehler können in einer Informationsverzerrung liegen. Diese entsteht beispielweise bei der Datenerhebung bzw. deren Analyse. Durch die doppelte Kontrolle der Datenerfassung wird dieser Fehler minimiert.

Darüber hinaus stellt der Genotypisierungsablauf eine Fehlerquelle dar: Übertragungs- bzw. Pipettierfehler sind nicht systemischer Natur, sind jedoch nicht zu unterschätzen.

## 4.1 Blutdruckschwelle einer antihypotensiven Therapie

In der aktuellen Studie von Batton et al. sollte eine Blutdruckschwelle gefunden werden, unter der eine antihypotensive Therapie sinnvoll ist. Sie beobachteten bei behandelten Neugeborenen eine erhöhte Inzidenz von ROP sowie von IVH bei einem insgesamt schlechteren Outcome im Vergleich zur unbehandelten Gruppe. Daraufhin forderten sie, auf andere Entscheidungshilfen als den Blutdruck zur antihypotensiven Therapie zurückzugreifen (Batton et al., 2013). Auch Lightburn et al. beobachteten in ihrer jüngsten Studie nach zu starker Erhöhung des Blutdrucks einen Anstieg von IVH, PVL, Entwicklungsverzögerung und Hörverlust (Lightburn et al., 2013). Dempsey und Barrington verglichen verschiedene Studien miteinander und sahen das Problem darin, dass es artifiziell sehr viele Frühgeborene mit dem gleichzeitigen Auftreten von Hypotension und IVH gäbe, wenn nur ein einziger Schwellenwert für Hypotension vorliegen würde. IVH kommt generell bei Frühgeborenen gehäuft vor. Als Lösung schlugen sie eine Korrektur mittels GA und Geburtsgewicht vor. Eine Blutdruckschwelle lehnten Dempsey und Barrington auch insofern ab, als dass der Blutdruck viel zu individuell wäre, um daraus generelle Therapieempfehlungen abzuleiten (Dempsey und Barrington, 2007).

Ähnlich wie Batton et al. erkannten auch Cox und Groves die schwache Assoziation zwischen dem Blutdruck und der zerebralen Perfusion. Sie forderten einen Parameter, der die zerebralen Flüsse besser widerspiegelte (Cox und Groves, 2012). Der Surrogatparameter Blutfluss bildete eine adäquate Organperfusion ab. Solange der Blutfluss ausreichend war, konnte der Blutdruck außer Acht gelassen werden (Gagliardi, 2013). Ahn et al. forderten die Akzeptanz einer „permissive hypotension“ mit einer Therapieentscheidung nicht nach Blutdruckwerten, sondern nach Perfusionszeichen (Hautfarbe, Rekapillarierungszeit, Urinproduktion, Blutlaktat und Azidose) (Ahn et al., 2012). Denn durch eine antihypotensive Therapie steigt zwar der Blutdruck, die zerebrale Oxygenierung bleibt jedoch unverändert (Garner und Burchfield, 2013).

## 4.2 Besonderheiten der antihypotensiven Therapie bei Frühgeborenen

Die Tatsache, dass das kardiale und vaskuläre System bei Neugeborenen noch nicht vollständig ausgereift ist, begrenzt die möglichen Interventionen und lässt sie unvorhersehbarer werden (Barrington, 2013). Erschwert wird die Datenlage durch einen Mangel an prospektiven randomisierten kontrollierten Studien, der sich aus der Situation ergibt: Gerade im Zeitraum der Geburt eines Frühgeborenen befinden sich die Eltern in einer kritischen Phase. Oft ist die Mutter unter Medikamenteneinfluss nicht einwilligungsfähig. Hinzu kommt, dass das Zeitfenster sehr kurz ist (Batton et al., 2012). Auch ethische Gründe lassen randomisierte Studien kaum zu. Stattdessen kann nur auf retrospektive Analysen oder Tiermodelle zurückgegriffen werden (Azhan und Wong, 2012).

Bei der Therapieentscheidung muss man sich vor Augen führen, dass die Medikamente in anderen Kreislaufverhältnissen als beim Reifgeborenen bzw. Erwachsenen wirken. Frühgeborene haben aufgrund ihres physiologisch erhöhten Ruheherzschlages deutlich weniger kardiale Reserven, die durch Frequenzsteigerungen mobilisiert werden können. Die Dichte der kardialen adrenergen Rezeptoren sowie die generelle kardiale Innervation ist vermindert, was zur Folge hat, dass das Herz weniger auf eine positiv inotrope Intervention

reagiert (Kluckow, 2005). Dies wird durch den Sachverhalt der reduzierten Mitochondrienzahl sowie einen verringerten Energiespeicher verstärkt (Takahashi et al., 1997; Osborn et al., 2007). Durch ein Überwiegen der konstriktorischen  $\alpha$ - über die dilatatorischen  $\beta$ -Rezeptoren in der Peripherie weisen Frühgeborene einen erhöhten Ruhetonus auf (Whitsett et al., 1982). Bei einer gleichzeitig bestehenden verstärkten Sensibilität des Myokards für einen erhöhten Afterload sinkt die Kontraktilität des Herzens, während die Resistance steigt (Takahashi et al., 1997; Cox und Groves, 2012). Azhan und Wong zeigten in Untersuchungen an neugeborenen Lämmern einen Anstieg des systemischen Metabolismus sowie des Sauerstoffverbrauchs nach Dobutamingabe. Dieser Effekt war bei den ein bis zwei Tage alten Lämmern um das 7 bis 10fache stärker ausgeprägt als bei ihren älteren Artgenossen. Dies spiegelt die divergierenden Verhältnisse im frühgeborenen Kreislauf wider (Azhan und Wong, 2012).

Aber auch in ihrer zerebralen Wirkung lassen sich deutliche Unterschiede der Pharmaka bei Anwendung an Frühgeborenen im Vergleich zu Reifgeborenen feststellen. In ihrer aktuellen Studie formulierten Azhan und Wong das Problem, dass die meisten Medikamente am kardialen System ansetzen, während die Wirkung auf das zerebrale System in der Anwendung am Frühgeborenen oft unbekannt ist. Monoamine, zu denen auch die Katecholamine zählen, sind beim Erwachsenen nicht in der Lage, die Bluthirnschranke zu passieren, sodass sie den zerebralen Metabolismus kaum beeinflussen. In Tierversuchen konnte jedoch gezeigt werden, dass durch Umgehen der Bluthirnschranke bei direkter zerebraler Applikation ein Anstieg des zerebralen Metabolismus sowie des CBF zu messen war. Da die Bluthirnschranke bei Frühgeborenen noch nicht vollständig ausgebildet ist, könnte dies einen möglichen zerebralen Wirkmechanismus der Katecholamine darstellen (Azhan und Wong, 2012).

Die Arbeitsgruppe um Lightburn untersuchte bei ELBW-Frühgeborenen die zerebrale Hämodynamik nach Dopamingabe am ersten Lebenstag. Die Ergebnisse zeigen sowohl einen Anstieg des CBF als auch des MAP durch das Dopamin. Jedoch war der  $\text{CO}_2$ -Druck vor und nach Gabe unverändert. Lightburn et al. befürchteten bei einem zu abrupten Blutdruckanstieg in hypotensiven Frühgeborenen mit einer gestörten zerebralen Autoregulation durch Zunahme des CBF eine erhöhte Inzidenz von IVH. Sie kritisierten den Einsatz von Dopamin

ohne belegten Nutzen (Lightburn et al., 2013). Verschiedene Forschungsgruppen beschrieben ein vermehrtes Auftreten von IVH, PVL, ROP, NEC, BPD sowie neurologischer Entwicklungsstörungen in Folge einer frühen antihypotensiven Therapie. Zudem wurden ein gesteigerter Gebrauch von Surfactant und eine erhöhte Beatmungspflichtigkeit in der Gruppe der mit Inotropika behandelten Frühgeborenen beobachtet (Martens et al., 2003; Fanaroff et al., 2006; Wong et al., 2015). Eine Erklärung bot die Pulsatilitätstheorie, nach der auch ein zu hoher Blutdruck in Bezug auf die IVH gefährlich ist. Sie stützte sich auf beobachtete Assoziationen zwischen Blutdruck, CBF, dem Pulsatilitätsindex und dem IVH-Risiko (Al-Aweel et al., 2001). Alternativ kommt jedoch auch der vorbestehende niedrige Blutdruck als Ursache der neurologischen Entwicklungsstörung in Frage. Aktuelle Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe (Faust et al., 2015) zeigten an VLBW-Kindern eine erhöhte Inzidenz von IVH bei Ausbleiben einer Therapie eines niedrigen MAP in den ersten 24 Lebensstunden. Diese Ergebnisse würden gegen das Prinzip der „permissive hypotension“ sprechen. Bereits ältere Studien verwiesen auf eine eindeutige Korrelation zwischen einer IVH und Perioden der Hypotension (Watkins et al., 1989).

Batton et al. berichteten, dass bei sehr unreifen Frühgeborenen trotz Therapie das Kurz- und Langzeitoutcome bei hypotensiven Kindern im Vergleich zu normotensiven Kindern schlechter war (Batton et al., 2009). Sie beobachteten kein verbessertes Outcome durch eine Therapie. Stattdessen konnten sie einen Anstieg des MAP bei den unbehandelten Frühgeborenen um 0,3 mmHg pro Stunde in den ersten 24 Stunden sowie eine etwas verlangsamte stündliche Zunahme des Druckes um 0,1 mmHg in den darauffolgenden 25 bis 48 Stunden messen. Im Anschluss daran stabilisierte sich der Blutdruck bis ans Ende der ersten Lebenswoche (Batton et al., 2007).

In der jüngsten Studie von Garner und Burchfield wurde beobachtet, dass bei einer antihypotensiven Therapie ab einem Blutdruck unter 30 mmHg der Blutdruck zwar anstieg, die zerebrale Oxygenierung jedoch konstant blieb. Sie erklärten dies mit einer möglichen Autoregulation des CBF (Garner und Burchfield, 2013).

Ebenso kritisch diskutiert wird der Einsatz einer Volumentherapie, die oft bei schlechter Perfusion erfolgt. In einer aktuellen Studie der Arbeitsgruppe um Kooi et al. wurde die Cerebral Fractional Tissue Oxygen Extraction (CFTOE) untersucht. Im Gegensatz zum MAP, der nach Volumengabe anstieg, blieb die

CFTOE von dieser jedoch unbeeinflusst. Auch hier wird deutlich, dass der Blutdruck als Perfusionsmaß kritisch zu hinterfragen ist. An dieser Stelle sei noch einmal auf den beschriebenen Ansatz der „permissive hypotension“ hingewiesen. Es stellt sich die Frage, ob der Effizienz dieses Ansatzes nicht ein Hawthorne-Effekt, bedingt durch die erhöhte Aufmerksamkeit im Rahmen der gesteigerten Beobachtungsfrequenz, zugrunde liegt (Kooi et al., 2013).

Eine Messmethode der kontinuierlichen lokalen zerebralen Gewebeoxygenierung stellt beispielweise die Near Infrared Spectroscopy (NIRS) dar. Sie eignet sich zum kontinuierlichen nicht invasiven Monitoring. Gemessen wird die venöse Sättigung (Garner und Burchfield, 2013). Auch Shah et al. beleuchteten in ihrer Studie an Zwillingen die Problematik einer adäquaten Perfusionsvariablen. Während ein untersuchter Zwilling unter normalem Blutdruck eine schwere IVH entwickelte und an deren Folgen verstarb, blieb der hypotensive Zwilling klinisch unauffällig. Letzterer wies einen normalen Vena-cava-Flow auf, der beim verstorbenen Zwilling erniedrigt war (Shah et al., 2012).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Blutfluss als wichtige Variable in der Entscheidung zur antihypotensiven Therapie anzusehen ist. Eine individuelle Betrachtung jedes kleinen Patienten unter Einbeziehen weiterer klinischer Perfusionszeichen vermeidet überflüssige Medikation (Ahn et al., 2012). Die Evidenzbasis der „permissive hypotension“ im Hinblick auf seine Empfehlungsstärke ist bisher jedoch gering. Entsprechende Interventionen sollten in randomisierten kontrollierten Studien vermehrt auf ihr Langzeit-Outcome untersucht werden. Die vorliegende Studie leistet dazu einen Beitrag, da im Rahmen des GNN-Projektes explorative Analysen von genetischen Faktoren bei Frühgeborenen stattfanden und erste Schritte für eine Reihe weiterer Follow-Up-Untersuchungen im höheren Lebensalter ehemaliger Frühgeborener eingeleitet wurden.

### 4.3 Ausstreichen der Nabelschnüre – mögliche Prävention der Hypotension

Wie in randomisierten kontrollierten Studien gezeigt werden konnte, ist das Ausstreichen von Nabelschnüren sowie das verzögerte Abklemmen der Nabelschnur eine mögliche Therapie, um das Blutvolumen des Neugeborenen zu erhöhen. Dem zugrunde liegt die Beobachtung, dass das Blutvolumen des Neugeborenen innerhalb der ersten 5 bis 15 Sekunden nach der Geburt durch uterine Kontraktionen um  $5 \text{ bis } 15 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$  ansteigt (March et al., 2013). Durch dieses zusätzliche Blutvolumen kann der Bedarf an Erythrozytenkonzentraten bei einem dann signifikant selteneren Auftreten von Anämien gesenkt werden. Da schon ein milder Eisenmangel mit damit einhergehender Anämie zu kognitiven Defiziten führt, kann dem somit entgegengewirkt werden. Auch IVH, NEC und Sepsis treten seltener bei länger bestehender Verbindung zur Plazenta auf. Stattdessen verbessert diese einfach durchführbare Therapie den Hämatokrit zur Geburt und führt mit 96 vs. 107 g/l zu einer deutlich höheren Hämoglobinkonzentration nach 10 Wochen im Vergleich zu den sofort Abgenabelten (Ultee et al., 2008).

Im Hinblick auf diese Arbeit ist der signifikant höhere systemische Blutdruck bei Frühgeborenen in den ersten 12 Stunden nach Ausstreichen der Nabelschnur besonders interessant. Auch der Gradient des mittleren systemischen Blutdrucks war in den Neugeborenen nach Ausstreichen der Nabelschnur signifikant geringer (1,3 vs. 6,3 mmHg) (Hosono et al., 2009).

Da Frühgeborene postnatal oft in einem kritischen Zustand sind, bleibt keine Zeit, 3 Minuten bis zum verspäteten Abklemmen zu warten. Stattdessen muss das Neugeborene möglichst schnell den Neonatologen übergeben werden, um zum Beispiel sofort mit der Reanimation zu beginnen. Um die Zeit beim verzögerten Abklemmen zu verkürzen, kann die Nabelschnur stattdessen ausgestrichen werden. Dazu wird die Nabelschnur distal des Nabels dreimal hintereinander in Richtung Neugeborenen ausgestrichen. Das Abklemmen der Nabelschnur erfolgt direkt im Anschluss ohne Verzögerung. Dieser Vorgang nimmt kaum mehr Zeit in Anspruch als das alleinige Abklemmen.

Im Hinblick auf einen ggf. kritischen postnatalen Kreislauf stellt diese Form der Autotransfusion eine Therapie zur schnellen und einfachen Stabilisierung dar (Katheria et al., 2014<sup>4</sup>). Durch das Ausstreichen konnten ein signifikant höherer

SVC sowie ein erhöhter rechtsventrikulärer Output nach 6 und 30 Stunden gemessen werden. Zudem sank der Anteil der Kinder, die eine Sauerstofftherapie benötigten (Katheria et al., 2014<sup>b</sup>). Auch eine Stabilisierung von zerebraler Oxygenierung und Perfusion konnte gezeigt werden, denn durch Erhöhung der linksventrikulären Vorlast steigt nach dem Frank-Starling-Mechanismus die linksventrikuläre Funktion (Takami et al., 2012).

Die einzelnen Studien wichen untereinander z.T. stark in ihrer zeitlichen Definition von frühem bzw. verzögertem Abklemmen ab. Während beim frühen Abklemmen meist von einer Zeit von 5 bis 15 Sekunden ausgegangen wurde, reichte der Zeitraum des untersuchten verzögerten Anlegens der Nabelschnurklammer von 30 Sekunden bis zu 2 Minuten. In einer Studie über am Termin geborene Neugeborene wurden sogar erst in der Kohorte, deren Nabelschnur nach 3 Minuten abgeklemmt wurde, signifikante Anstiege des Serumferritins im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen, in denen das Abklemmen schon nach 15 Sekunden bzw. 1 Minute erfolgte, gemessen (Ceriani et al., 2010).

In Bezug auf das verzögerte Abklemmen kann in diesem Zusammenhang festgehalten werden, dass sowohl bei Früh- als auch bei Reifgeborenen ein verbessertes Outcome zu verzeichnen war. Für einen signifikanten Effekt musste die Verzögerung beim Reifgeborenen jedoch deutlich länger sein. Die Number Needed To Treat (NNT) lag in einer Studie an 400 reifgeborenen Kindern bei 20 (Andersson et al., 2011).

Bei einer generellen Empfehlung zur postnatalen Anwendung des verzögerten Abklemmens bzw. Ausstreichens der Nabelschnur muss allerdings sichergestellt sein, dass die Möglichkeit zur Phototherapie zur Behandlung eines Ikterus vorhanden ist. Denn durch das zugeführte Blutvolumen steigt die Hämoglobinkonzentration und infolgedessen fällt mehr Bilirubin an. Insgesamt bestand bei den Frühgeborenen, die eine der beiden Formen der Autotransfusion erhielten, häufiger die Notwendigkeit einer Phototherapie bei Ikterus (McDonald et al., 2013).

Als Therapie der Hypotension bei Frühgeborenen ist die Autotransfusion im Vergleich zur Gabe von Erythrozytenkonzentraten mit den damit einhergehenden Risiken eine sichere Form zur temporären Kreislaufstabilisation. Dabei handelt es sich jedoch im Grunde genommen um eine Form von Volumentherapie, die wie

oben bereits dargestellt einen nur mäßigen Einfluss auf den Blutfluss als eigentlichen Parameter der Sauerstoffversorgung nimmt. Die Arbeitsgruppe um Katheria et al. konnte allerdings erhöhte Blutflüsse verbunden mit einer verbesserten zerebralen Oxygenisierung nachweisen (Katheria et al., 2014<sup>b</sup>).

#### 4.4 Frühgeborene und Hypertension im Erwachsenenalter

Während Frühgeborene an ihren ersten Tagen zur Hypotension neigen, entwickelt die gleiche Patientengruppe im Erwachsenenalter paradoxerweise oft ein metabolisches Syndrom mit signifikant höheren Blutdruckwerten als ihre reifgeborenen Gleichaltrigen. In ihrem systematischen Review, in dem Parkinson et al. ehemalige Frühgeborene (GA < 37 SSW) Reifgeborenen in einem Alter von mindestens 18 Jahren in Bezug auf verschiedene metabolische Parameter gegenüberstellten, beobachteten sie signifikant höhere Werte bei den ehemaligen Frühgeborenen sowohl im Systolischen Blutdruck (SBP) (Differenz von 4,2 mmHg) und im 24-Stunden-SBP (3,1 mmHg) als auch im Diastolischen Blutdruck (DBP) (2,6 mmHg). Letzterer Unterschied war jedoch nur bei den Frauen signifikant. Das Durchschnittsalter betrug 32,1 Wochen bzw. 19,6 Jahre (Parkinson et al., 2013).

Da bei Frühgeborenen durch eine verbesserte perinatale Versorgung und den medizinischen Fortschritt ein gesteigertes Outcome mit verminderter Mortalität zu verzeichnen ist, steigt die Zahl der adulten ehemaligen Frühgeborenen (Parkinson et al., 2013). In der Analyse von Parkinson et al. war auffällig, dass für die meisten Parameter, die mit dem metabolischen Syndrom assoziiert sind, keine Unterschiede zwischen Früh- und Reifgeborenen im Erwachsenenalter bestanden. Sowohl im body mass index (BMI), in der waist-to-hip-ratio (WHR) und der prozentualen Fettmasse (%-FM) als auch im Glukosestoffwechsel wichen die Werte nicht signifikant voneinander ab. Auch der Fettstoffwechsel zeigte keine Abhängigkeit vom Geburtszeitpunkt. Lediglich die Konzentration von LDL war in ehemaligen Frühgeborenen signifikant erhöht, was mit einem gesteigerten Atheroskleroserisiko einherging. Alle Beobachtungen blieben auch in genderspezifischen Analysen bestehen. Generell wiesen Frauen einen größeren Unterschied als Männer auf. Subgruppenanalysen zeigten, dass der gemessene

Blutdruckanstieg im Erwachsenenalter bei ehemaligen Frühgeborenen unabhängig vom sozioökonomischen Status war.

Dieser von Parkinson et al. publizierte Zusammenhang zwischen Frühgeburtlichkeit und späterem Auftreten erhöhter Blutdruckwerte ist insofern relevant, als dass Hypertension ein Risikofaktor für Koronare Herzkrankheit, Schlaganfall sowie renales Versagen darstellt. Schon eine Verminderung des Blutdrucks um 2 mmHg senkt das Risiko, eine Hypertension zu entwickeln um 17%. Gleichzeitig sinkt die Herzinfarkttrate um 6%, während ein Schlaganfall bis zu 15% seltener auftritt (Parkinson et al., 2013).

Die Ursache für diese Entwicklung von einem besonders kleinen, leichten Körperbau der Frühgeborenen mit geringem BMI in Kindheit und Adoleszenz zu höheren Werten als bei gleichaltrigen Reifgeborenen ist bisher noch ungeklärt. Eine Erklärung könnten Störungen in der endothelialen Funktion darstellen. In Ermangelung an Studien mit ausreichender Fallzahl konnte dies jedoch bisher nicht validiert werden. Ein weiterer Erklärungsansatz geht davon aus, dass das dritte Trimester in utero durch die zu frühe Geburt unter untypischen Bedingungen abläuft. Das letzte Trimester ist jedoch besonders wichtig für die Nephrogenese, die erst mit einem GA von 36 SSW endet. Dadurch könnte eine veränderte renale Morphologie und Funktion bedingt sein, was Einfluss auf den Blutdruck nehmen kann. Auch hier fehlen bisher aussagekräftige Studien (Parkinson et al., 2013).

## 4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Trotz einer vergleichsweise großen Kohorte Frühgeborener mit einem sehr niedrigen Geburtsgewicht (< 1.500 Gramm) konnten die in der GWAS gefundenen Polymorphismen, die mit einer Katecholamintherapie assoziiert waren, in der darauffolgenden Replikation nicht bestätigt werden. Dies schließt jedoch eine genetische Komponente nicht aus. Vielmehr sollten in der Zukunft mit wachsender Zahl der GNN-Studienteilnehmer weitere Untersuchungen auf Assoziationen bestimmter Polymorphismen mit dem Hypotonus am ersten Tag unternommen werden. Dabei wird sich zeigen, ob die hier berichteten Regionen im größeren Kollektiv eine signifikante Assoziation zeigen.

Weitere Ansatzpunkte für Folgearbeiten stellen die Ergebnisse der GWAS3D-Analyse dar. In diesem Zusammenhang könnte der Bereich der „intergenischen Wüste“ weiter beleuchtet und ein Augenmerk auf die Bedeutung der regulatorischen Bereiche gelegt werden. Neben genetischen Faktoren spielen jedoch v.a. Umweltfaktoren eine Rolle. Deshalb sind Modelle zu betrachten, die Gen-Umwelt-Interaktionen berücksichtigen.

Eine Beobachtung war zudem die Assoziation einiger der von uns gefundenen Polymorphismen mit einer erhöhten Mortalität. In Bezug darauf wäre es interessant, die Relevanz der Polymorphismen auf das Langzeitoutcome zu berechnen. Bisher liegen im Rahmen der GNN- sowie der Neo-Studie nur Daten zum kurzfristigen Outcome vor. In Kürze wird jedoch im Rahmen der Fünfjahres-Untersuchung der GNN-Studie eine weitere Evaluation von Daten erfolgen.

## 5 Zusammenfassung

VLBW-Frühgeborene weisen im Vergleich zu Reifgeborenen am ersten Lebenstag signifikant häufiger einen niedrigen Blutdruck auf. Diese Hypotension ist assoziiert mit einem kritischen Outcome. Ein niedriger Blutdruck am ersten Lebenstag gilt als unabhängiger Risikofaktor für IVH, BPD und Mortalität.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die genetische Grundlage für das Auftreten des niedrigen Blutdrucks am ersten Lebenstag sehr kleiner Frühgeborener zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden von September 2003 bis Ende 2013 10.547 Kinder mit einem Geburtsgewicht unter 1.500 Gramm und einem Gestationsalter  $\leq 36+6$  SSW aus insgesamt 54 teilnehmenden Kliniken in unsere Studie eingeschlossen. Mithilfe von drei standardisierten Fragebögen sowie ärztlich durchgeführten Untersuchungen wurden präklinische und therapeutische Daten gesammelt. Zusätzlich erhielt die Studienzentrale vom Neugeborenen zwei Mundschleimhautabstriche sowie ein kurzes Stück gefrorener Nabelschnur. Mit der daraus isolierten DNS erfolgte eine GWAS mit anschließender Imputation. Es resultierte eine Assoziation der SNPs rs12263698, rs6481071, rs6110241 und rs6135128 mit dem Surrogatparameter „Katecholamintherapie“. Zusätzlich wurden im Rahmen des Online-Servers GWAS3D weitere assoziierte Polymorphismen gesucht. Die dabei gefundenen SNPs rs213561 und rs10137975 stellen signifikant regulatorische intergenische Varianten dar. In der nachfolgenden Replikation konnten jedoch weder die in der GWAS noch die in der GWAS3D gefundenen SNPs bestätigt werden. Sekundäranalysen zeigten eine Häufung der Todesfälle in der Gruppe der Frühgeborenen mit den Polymorphismen rs6110241 sowie rs6135128. Hier rücken die bald erfolgenden Follow-up-Untersuchungen der nun Fünfjährigen in den Fokus. Auch wenn Umweltfaktoren einen großen Einfluss auf die Entstehung des niedrigen Blutdrucks bei sehr kleinen Frühgeborenen ausüben, sind genetische Ursachen nicht ausgeschlossen. Zu ihrem Nachweis bedarf es nachfolgender Studien mit größerer Fallzahl. Ziel ist es, weitere diagnostische und therapeutische Maßnahmen zu etablieren, um sehr kleine Frühgeborene in ihren ersten Lebensstunden noch besser zu stabilisieren.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ahn SY, Kim ES, Kim JK, Shin JH, Sung SI, Jung JM, Chang YS, Park WS (2012)** Permissive hypotension in extremely low birth weight infants ( $\leq 1000$  gm). *Yonsei Medical Journal* 53, 765–771.
- Al-Aweel I, Pursley DM, Rubin LP, Shah B, Weisberger S, Richardson DK (2001)** Variations in prevalence of hypotension, hypertension, and vasopressor use in NICUs. *Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association* 21, 272–778.
- Andersson O, Hellström-Westas L, Andersson D, Domellöf M (2011)** Effect of delayed versus early umbilical cord clamping on neonatal outcomes and iron status at 4 months: a randomised controlled trial. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)* 343, 7157.
- Azhan A, Wong FY (2012)** Challenges in understanding the impact of blood pressure management on cerebral oxygenation in the preterm brain. *Frontiers in Physiology* 3, 471.
- Barrington KJ (2013)** Common hemodynamic problems in the neonate. *Neonatology* 103, 335-340.
- Batton B, Li L, Newman NS, Das A, Watterberg KL, Yoder BA, Faix RG, Laughon MM, Stoll BJ, Van Meurs KP, Carlo WA, Poindexter BB, Bell EF, Sánchez PJ, Ehrenkranz RA, Goldberg RN, Laptook AR, Kennedy KA, Frantz ID 3rd, Shankaran S, Schibler K, Higgins RD, Walsh MC (2013)** Use of antihypotensive therapies in extremely preterm infants. *Pediatrics* 131, 1865-1873.
- Batton B, Zhu X, Fanaroff J, Kirchner HL, Berlin S, Wilson-Costello D, Walsh M (2009)** Blood pressure, anti-hypotensive therapy, and neurodevelopment in extremely preterm infants. *The Journal of Pediatrics* 154, 351-357.
- Batton B, Batton D, Riggs T (2007)** Blood pressure during the first 7 days in premature infants born at postmenstrual age 23 to 25 weeks. *American Journal of Perinatology* 24, 107–115.
- Batton BJ, Li L, Newman NS, Das A, Watterberg, KL, Yoder BA, Faix RG, Laughon MM, Van Meurs KP, Carlo WA, Higgins RD, Walsh MC (2012)** Feasibility study of early blood pressure management in extremely preterm infants. *The Journal of Pediatrics* 161, 65-69.
- Beck S, Wojdyla D, Sale L, Betran AP, Merialdi M, Requejo JH, Rubens C, Menon R, Van Look PFA (2010)** The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bulletin of the World Health Organization* 88, 31–38.

- Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller AB, Narwal R, Adler A, Vera Garcia C, Rohde S, Say L, Lawn JE (2012)** 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, 2162–2172.
- Boyle EM, Poulsen G, Field DJ, Kurinczuk JJ, Wolke D, Alfirevic Z, Quigley MA (2012)** Effects of gestational age at birth on health outcomes at 3 and 5 years of age: population based cohort study. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)* 344, 896.
- Ceriani Cernadas JM, Carroli G, Pellegrini L, Ferreira M, Ricci C, Casas O, Lardizabal J, Morasso C (2010)** The effect of early and delayed umbilical cord clamping on ferritin levels in term infants at six months of life: a randomized, controlled trial. *Archivos Argentinos de Pediatría* 108, 201-208.
- Clarke GM, Carter KW, Palmer LJ, Morris AP, Cardon LR (2007)** Fine mapping versus replication in whole-genome association studies. *American Journal of Human Genetics* 81, 995–1005.
- Colhoun HM, McKeigue PM, Davey Smith G (2003)** Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet* 361. 865-872.
- Cox DJ, Groves AM (2012)** Inotropes in preterm infants--evidence for and against. *Acta Paediatrica* 101, 17–23.
- dbSNP** (o.V.). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/> (Tag des Zugriffs: 01.05.2014).
- Dempsey EM, Barrington KJ (2007)** Treating hypotension in the preterm infant: when and with what: a critical and systematic review. *Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association* 27, 469–478.
- Edwards SL, Beesley J, French JD, Dunning AM (2013)** Beyond GWASs: illuminating the dark road from association to function. *American Journal of Human Genetics* 93, 779–797.
- Evangelou E, Maraganore DM, Ioannidis JPA (2007)** Meta-analysis in genome-wide association datasets: strategies and application in Parkinson disease. *Plos One* 2, 196.
- Fanaroff JM, Wilson-Costello DE, Newman NS, Montpetite MM, Fanaroff AA (2006)** Treated hypotension is associated with neonatal morbidity and hearing loss in extremely low birth weight infants. *Pediatrics* 117, 1131–1135.
- Faust K, Härtel C, Preuss M, Rabe H, Roll C, Emeis M, Wieg C, Szabo M, Herting E, Göpel W (2015)** Short term outcome of very low birth weight infants with arterial hypotension in the first 24 hours of life. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition* 100, 388-392.
- Gagliardi L (2013)** Treatment of hypotension in preterm infants: pathophysiology versus evidence-based medicine. *Acta Paediatrica* 102, 446–448.

- Garner** RS, Burchfield DJ (2013) Treatment of presumed hypotension in very low birthweight neonates: effects on regional cerebral oxygenation. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition* 98, 117–121.
- GWAS3D** - Detecting Human Regulatory Variants by Combining Genome Wide Association Study and Chromosome Conformation. (o.V.). <http://jjwanglab.org/gwas3d/Z3dhczNkLTE0MDExNzg3MTY> (Tag des Zugriffs: 14.06.2014).
- Heßler** N (2013) Genome-wide association analyses in sepsis: from quality control to meta-analysis. *Bachelorarbeit Lübeck*.
- Hindorff** LA, Sethupathy P, Junkins HA, Ramos EM, Mehta JP, Collins FS, Manolio TA (2009) Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 9362–9367.
- Hosono** S, Mugishima H, Fujita H, Hosono A, Okada T, Takahashi S, Masaoka N, Yamamoto T (2009) Blood pressure and urine output during the first 120 h of life in infants born at less than 29 weeks' gestation related to umbilical cord milking. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition* 94, 328–331.
- Howie** BN, Donnelly P, Marchini J (2009) A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. *Plos Genetics* 5, 1000529.
- Igl** BW, König IR, Ziegler A (2009) What do we mean by “replication” and “validation” in genome-wide association studies? *Human Heredity* 67, 66–68.
- Katheria** A, Blank D, Rich W, Finer N (2014<sup>a</sup>) Umbilical cord milking improves transition in premature infants at birth. *Plos One* 9, 94085.
- Katheria** AC, Leone TA, Woelkers D, Garey DM, Rich W, Finer NN (2014<sup>b</sup>) The Effects of Umbilical Cord Milking on Hemodynamics and Neonatal Outcomes in Premature Neonates. *The Journal of Pediatrics* 164, 1045-1050.
- Kluckow** M (2005) Low systemic blood flow and pathophysiology of the preterm transitional circulation. *Early Human Development* 81, 429-437.
- Kooi** EM, van der Laan ME, Verhagen EA, Van Braeckel KN, Bos AF (2013) Volume expansion does not alter cerebral tissue oxygen extraction in preterm infants with clinical signs of poor perfusion. *Neonatology* 103, 308-314.
- Larroque** B, Ancel PY, Marret S, Marchand L, André M, Arnaud C, Pierrat V, Rozé JC, Messer J, Thiriez G, Burguet A, Picaud JC, Bréart G, Kaminski M (2008) Neurodevelopmental disabilities and special care of 5-year-old children born before 33 weeks of gestation (the EPIPAGE study): a longitudinal cohort study. *Lancet* 371, 813-820.

- Laughon M, Bose C, Allred E, O'Shea TM, Van Marter LJ, Bednarek F, Leviton A** (2007) Factors associated with treatment for hypotension in extremely low gestational age newborns during the first postnatal week. *Pediatrics* 119, 273–280.
- Life Technologies Corporation** (2012) (o.V.)  
[http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/documents/generaldocuments/cms\\_085696.pdf?ICID=mp-taqman-gex-0910](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_085696.pdf?ICID=mp-taqman-gex-0910) (Tag des Zugriffs: 03.08.2014).
- Li MJ, Wang LY, Xia Z, Sham PC, Wang J** (2013) GWAS3D: Detecting human regulatory variants by integrative analysis of genome-wide associations, chromosome interactions and histone modifications. *Nucleic Acids Research* 41, 150-158.
- Lightburn MH, Gauss CH, Williams DK, Kaiser JR** (2013) Observational study of cerebral hemodynamics during dopamine treatment in hypotensive ELBW infants on the first day of life. *Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association* 33, 698–702.
- Logan JW, O'Shea TM, Allred EN, Laughon MM, Bose CL, Dammann O, Batton DG, Engelke SC, Leviton A** (2011) Early postnatal hypotension and developmental delay at 24 months of age among extremely low gestational age newborns. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition* 96, 321–328.
- March MI, Hacker MR, Parson AW, Modest AM, de Veciana M** (2013) The effects of umbilical cord milking in extremely preterm infants: a randomized controlled trial. *Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association* 33, 763–767.
- Martens S, Rijken M, Stoelhorst G, van Zwieten P, Zwinderman A, Wit J, Hadders-Algra M, Veen S** (2003) Is hypotension a major risk factor for neurological morbidity at term age in very preterm infants? *Early Human Development* 75, 79-89.
- McDonald SJ, Middleton P, Dowswell T, Morris PS** (2013) Effect of timing of umbilical cord clamping of term infants on maternal and neonatal outcomes. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 7, CD004074.
- Noori S, Seri I** (2005) Pathophysiology of newborn hypotension outside the transitional period. *Early Human Development* 81, 399-404.
- Osborn DA** (2005) Diagnosis and treatment of preterm transitional circulatory compromise. *Early Human Development* 81, 413-422.
- Osborn DA, Evans NJ** (2004) Early volume expansion for prevention of morbidity and mortality in very preterm infants. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2, CD002055.

- Osborn DA, Evans NJ, Kluckow M (2007)** Left ventricular contractility in extremely premature infants in the first day and response to inotropes. *Pediatric Research* 61, 335–340.
- Parkinson JRC, Hyde MJ, Gale C, Santhakumaran S, Modi N (2013)** Preterm birth and the metabolic syndrome in adult life: a systematic review and meta-analysis. *Pediatrics* 131, 1240–1263.
- Pei YF, Zhang L, Papasian CJ, Wang YP, Deng HW (2014)** On individual genome-wide association studies and their meta-analysis. *Human Genetics* 133, 265-279.
- Rios DR, Kaiser JR (2015)** Vasopressin versus dopamine for treatment of hypotension in extremely low birth weight infants: a randomized, blinded pilot study. *Journal of Pediatrics* 166, 850-855.
- Schleußner E (2013)** The Prevention, Diagnosis and Treatment of Premature Labor. *Deutsches Ärzteblatt International* 110, 227-236.
- Schwepcke A, Weber FD, Mormanova Z, Cepissak B, Genzel-Boroviczény O (2013)** Microcirculatory mechanisms in postnatal hypotension affecting premature infants. *Pediatric Research* 74, 186-190.
- Shah DM, Condò M, Bowen J, Kluckow M (2012)** Blood pressure or blood flow: which is important in the preterm infant? A case report of twins. *Journal of Paediatrics and Child Health* 48, 144-146.
- Takahashi Y, Harada K, Kishkurno S, Arai H, Ishida A, Takada G (1997)** Postnatal left ventricular contractility in very low birth weight infants. *Pediatric Cardiology* 18, 112-117.
- Takami T, Suganami Y, Sunohara D, Kondo A, Mizukaki N, Fujioka T, Hoshika A, Akutagawa O, Isaka K (2012)** Umbilical cord milking stabilizes cerebral oxygenation and perfusion in infants born before 29 weeks of gestation. *The Journal of Pediatrics* 161, 742-747.
- Teng M, Ichikawa S, Padgett LR, Wang Y, Mort M, Cooper DN, Koller DL, Foroud T, Edenberg HJ, Econs MJ, Liu Y (2012)** regSNPs: a strategy for prioritizing regulatory single nucleotide substitutions. *Bioinformatics* 28, 1879–1886.
- The ENCODE Project Consortium (2012)** An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489, 57–74.
- Ultee CA, van der Deure J, Swart J, Lasham C, van Baar AL (2008)** Delayed cord clamping in preterm infants delivered at 34–36 weeks' gestation: a randomised controlled trial. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition* 93, 20-23.
- Watkins AM, West CR, Cooke RW (1989)** Blood pressure and cerebral haemorrhage and ischaemia in very low birthweight infants. *Early Human Development* 19, 103-110.

- Whitsett** JA, Noguchi A, Moore JJ (1982) Developmental aspects of alpha- and beta-adrenergic receptors. *Seminars in Perinatology* 6, 125-141.
- Wong** J, Shah PS, Yoon EW, Yee W, Lee S, Dow K (2015) Inotrope use among extremely preterm infants in Canadian neonatal intensive care units: variation and outcomes. *American Journal of Perinatology* 32, 9-14.
- Zeitlin** J, Szamotulska K, Drewniak N, Mohangoo AD, Chalmers J, Sakkeus L, Irgens L, Gatt M, Gissler M, Blondel B (2013) Preterm birth time trends in Europe: a study of 19 countries. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 120, 1356–1365.
- Ziegler** A, König IR (2010) A Statistical Approach to Genetic Epidemiology – Concepts and Applications. 2. Aufl., Wiley-VHC Verlag, Weinheim.

## 7 Anhang

### 7.1 Anhang 1: Protokoll zur Isolierung von DNS aus Nabelschnur mit dem Gentra® Puregene® Tissue Kit

1. Nabelschnur ca. 100 mg kleingeschnitten  
+ 3 ml Cell Lysis Solution → auf Eis pipettieren  
+ 30 µl Puregene Proteinase K → vortexen  
über Nacht bei 55°C im Thermoschüttler inkubieren, Speed 600
2. + 15 µl RNase A Solution → vortexen  
für 1 Stunde bei 37°C im Thermoschüttler inkubieren, Speed 600
3. Für 3 Minuten im Eis runterkühlen
4. + 1 ml Protein Precipitation Solution und sofort 20 Sekunden hochtourig vortexen
5. 10 Min bei 5.000 rpm zentrifugieren: Die Proteine sollten jetzt in Form eines festen Pellets am Boden des Röhrchens sein
6. DNS-Überstand in ein neues Röhrchen mit 1 ml Protein Precipitation Solution überführen und die Proteinfällung wiederholen → auf Eis pipettieren
7. 3 ml Isopropanol 100% in ein neues Röhrchen pipettieren
8. DNS-Überstand dazugeben und das Röhrchen vorsichtig über Kopf schwenken
9. 5 Minuten bei 5.000 rpm zentrifugieren: DNS sollte jetzt als Pellet am Boden des Röhrchens sein
10. Überstand vorsichtig abgießen und das Röhrchen kopfüber auf sauberes Papier abtropfen lassen, dabei auf Pellet achten
11. + 3 ml Ethanol 70%, Probe vorsichtig durchspülen, um das DNS-Pellet zu waschen
12. 5 Minuten bei 5.000 rpm zentrifugieren
13. Alkohol vorsichtig abgießen, Röhrchen kopfüber auf Papier abtropfen lassen
14. Ethanolwaschschritt wiederholen (11.-13.)
15. Röhrchen kopfüber auf sauberem Papier für ca. 2 Stunden lufttrocknen lassen
16. + 150 µl DNS Hydration Solution, vorsichtig mit Pipette durchspülen
17. Über Nacht bei 25°C im Thermoschüttler inkubieren, Speed 300  
Alternativ bei Raumtemperatur auch länger stehen lassen, hin und wieder vorsichtig bewegen, da die langen DNS-Stränge sonst zerbrechen
18. DNS-Konzentrationsmessung: Einstellung auf 50 – 70 µg/µl

Zentrifuge: Heraeus Megafuge 2

## 7.2 Anhang 2: TaqMan® Prinzip

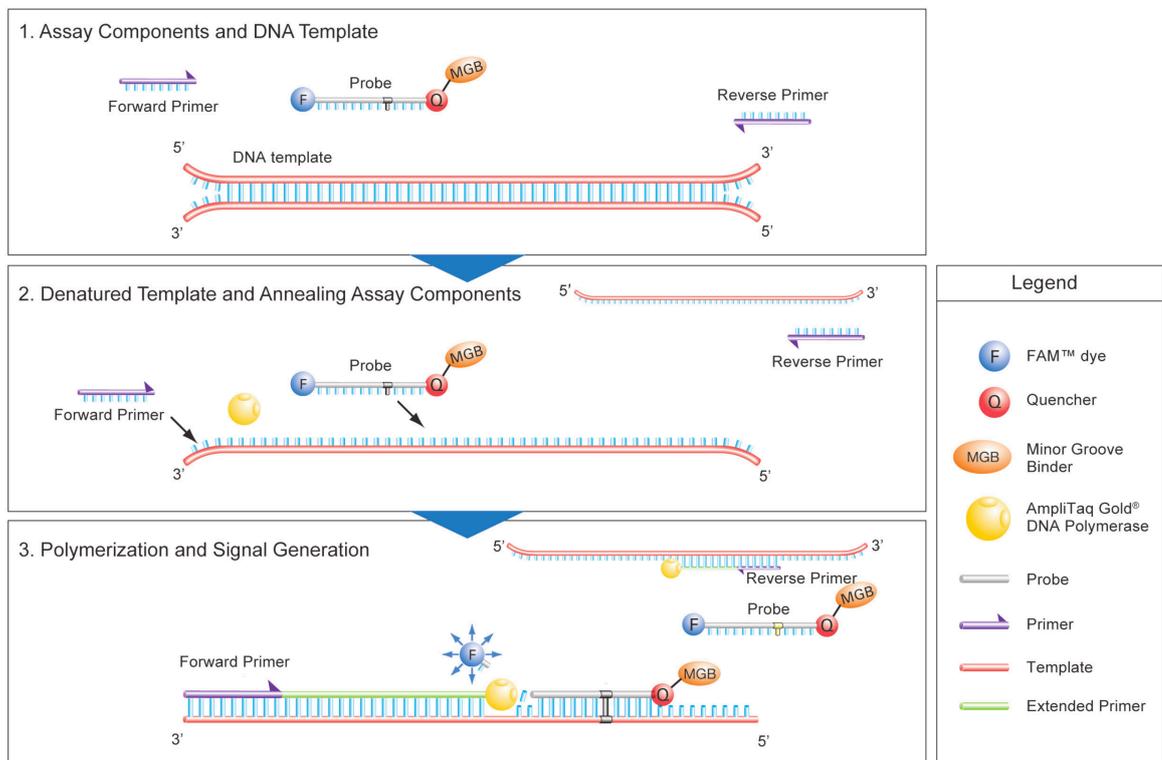
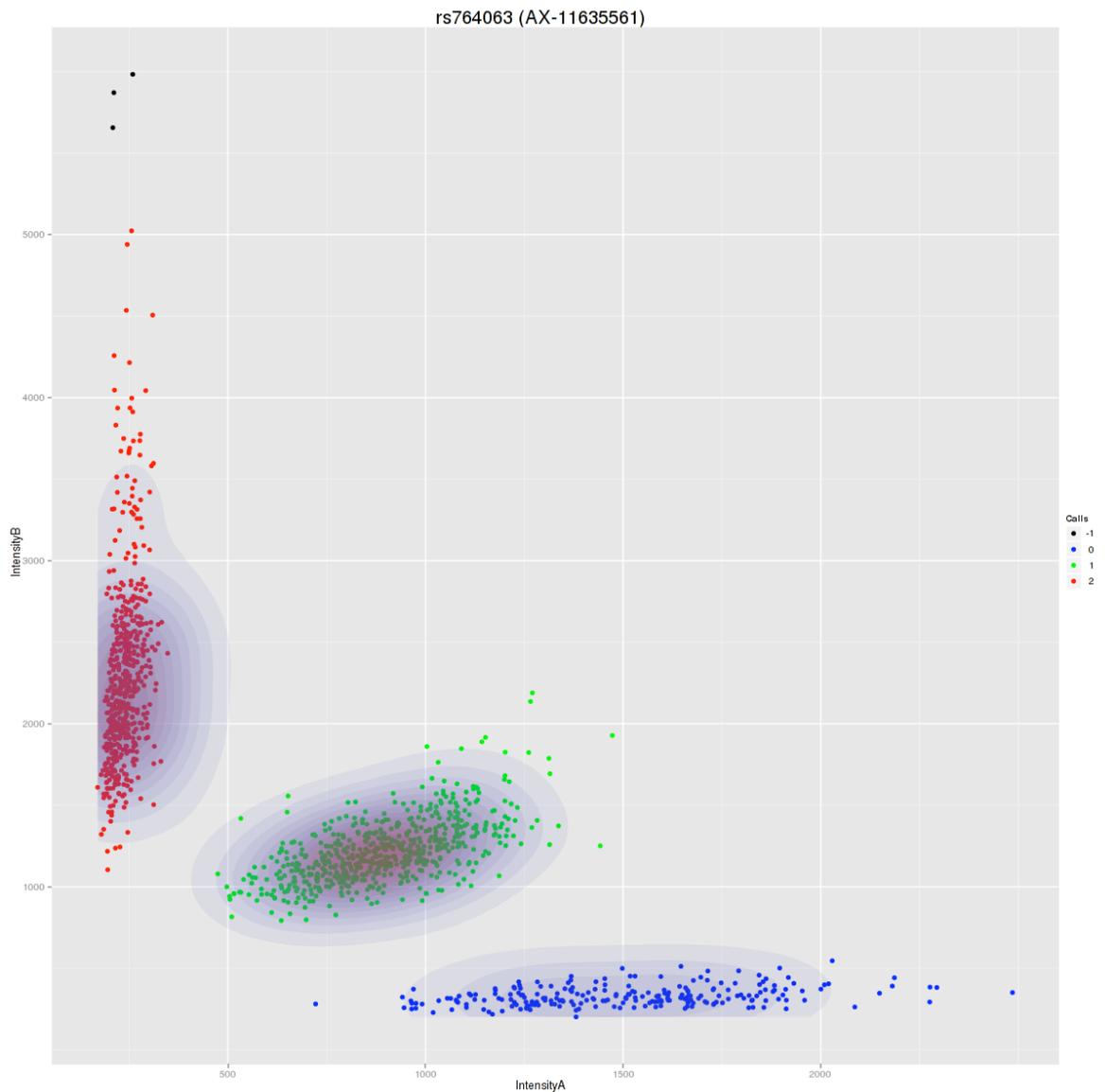


Abbildung 4: TaqMan® Prinzip

(nach Life Technologies Corporation:  
[http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/documents/generaldocuments/cms\\_085696.pdf?ICID=mp-taqman-gex-0910](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_085696.pdf?ICID=mp-taqman-gex-0910))

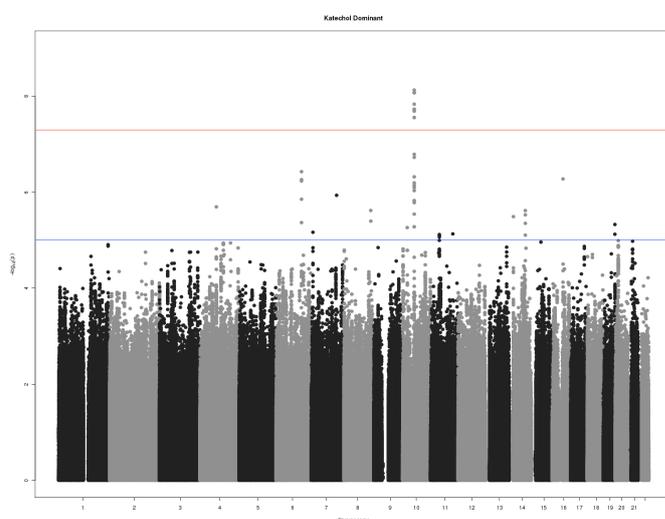
## 7.3 Anhang 3: Cluster Plot zur allelischen Diskriminierung



**Abbildung 5:** Cluster Plot zur allelischen Diskriminierung

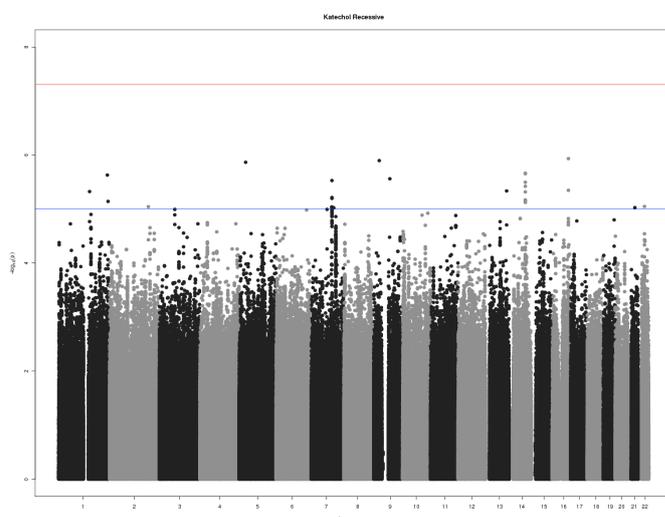
Darstellung eines SNPs mit guter Qualität: Separate Abbildung von drei Wolken in der räumlichen Auftrennung. Rote und blaue Wolke Homozygote, grüne Wolke Heterozygote

## 7.4 Anhang 4: Manhattanplots der GWAS zur Katecholamintherapie – weitere Modelle



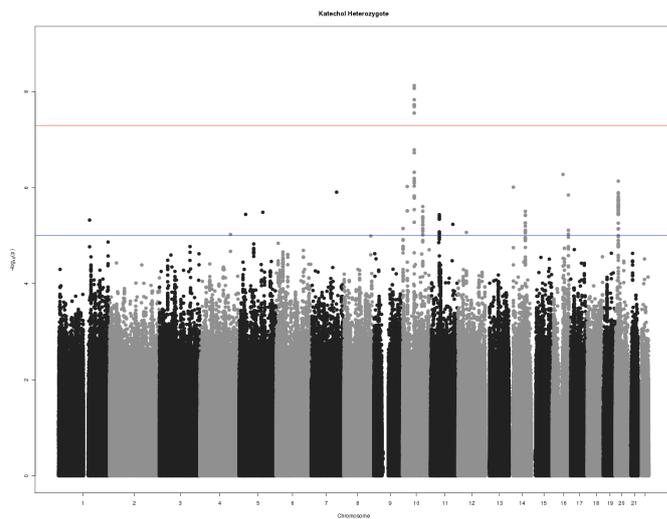
**Abbildung 6:** Manhattanplot der GWAS zur Katecholamintherapie - dominantes Modell.

Auch hier stellt sich ein SNP mit genomweiter Signifikanz in Chromosom 10 dar.



**Abbildung 7:** Manhattanplot der GWAS zur Katecholamintherapie - rezessives Modell.

Kein SNP erreicht genomweite Signifikanz. Es liegen lediglich einige SNPs im genomweit verdächtigen Bereich.



**Abbildung 8:** Manhattanplot der GWAS zur Katecholamintherapie - heterozygotes Modell.

Auch hier stellt sich ein SNP mit genomweiter Signifikanz in Chromosom 10 dar.

## 7.5 Anhang 5: Deskriptive und klinische Daten in Abhängigkeit vom Genotyp

**Tabelle 11:** Deskriptive Daten des Gesamtkollektivs in den verschiedenen Genotypen

Ant. LR: Antenatale Lungenreife.

| Genotyp                     |              | rs12263698 |      |      | rs6110241 |      |      | rs6135128 |      |      | rs6481071 |      |      |
|-----------------------------|--------------|------------|------|------|-----------|------|------|-----------|------|------|-----------|------|------|
|                             |              | AA         | AG   | GG   | GG        | GA   | AA   | GG        | GA   | AA   | CC        | CT   | TT   |
| <b>Geschlecht</b>           | Mädchen [%]  | 50,3       | 50,7 | 62,5 | 49,9      | 51,1 | 47,9 | 50,4      | 50,8 | 49,2 | 50,3      | 50,4 | 54,5 |
|                             | Junge [%]    | 49,7       | 49,3 | 37,5 | 50,1      | 48,9 | 52,1 | 49,6      | 49,2 | 50,8 | 49,7      | 49,6 | 45,5 |
| <b>Gestationsalter</b> [Wo] | Median       | 28,7       | 28,4 | 26,9 | 28,9      | 28,7 | 28,4 | 28,7      | 28,7 | 28,3 | 28,7      | 28,6 | 28,9 |
|                             | Perzentil 25 | 26,7       | 26,1 | 24,2 | 26,7      | 26,7 | 26,6 | 26,7      | 26,7 | 26,6 | 26,7      | 26,3 | 26,1 |
|                             | Perzentil 75 | 30,7       | 30,9 | 28,9 | 30,7      | 30,6 | 30,3 | 30,7      | 30,6 | 30,1 | 30,7      | 30,4 | 30,9 |
| <b>Geburtsgewicht</b> [g]   | Median       | 1100       | 990  | 850  | 1100      | 1100 | 1065 | 1100      | 1093 | 1053 | 1100      | 1028 | 990  |
|                             | Perzentil 25 | 830        | 740  | 665  | 835       | 825  | 810  | 830       | 830  | 830  | 833       | 773  | 830  |
|                             | Perzentil 75 | 1330       | 1325 | 1043 | 1330      | 1340 | 1285 | 1330      | 1340 | 1280 | 1330      | 1310 | 1190 |
| <b>Mehrling</b> [%]         |              | 36,0       | 37,4 | 12,5 | 36,4      | 36,1 | 25,7 | 36,5      | 35,6 | 26,5 | 35,8      | 37,1 | 18,2 |
| <b>Entbindung</b> [%]       | Spontan      | 12,3       | 11,8 | 42,9 | 12,1      | 13,2 | 14,5 | 12,1      | 12,0 | 13,8 | 12,4      | 11,5 | 30,0 |
|                             | Sectio       | 80,7       | 77,8 | 42,9 | 80,9      | 79,4 | 78,9 | 81,1      | 80,6 | 80,6 | 80,6      | 79,9 | 60,0 |
|                             | Notsectio    | 7,0        | 10,3 | 14,3 | 7,0       | 7,4  | 6,5  | 6,9       | 7,4  | 5,6  | 7,0       | 8,6  | 10,0 |
| <b>APGAR</b>                | Median       | 8          | 8    | 6    | 8         | 8    | 8    | 8         | 8    | 8    | 8         | 8    | 8    |
|                             | Perzentil 25 | 7          | 7    | 5    | 7         | 7    | 7    | 7         | 7    | 7    | 7         | 7    | 6    |
|                             | Perzentil 75 | 9          | 9    | 8    | 9         | 9    | 9    | 9         | 9    | 9    | 9         | 9    | 9    |
| <b>Ant. LR</b> [%]          |              | 89,2       | 87,6 | 87,5 | 88,8      | 89,3 | 90,4 | 89,0      | 89,9 | 89,2 | 89,2      | 87,3 | 90,9 |

**Tabelle 12:** Klinische Daten des Gesamtkollektivs in den verschiedenen Genotypen

Häufigkeiten der klinischen Endpunkte in den verschiedenen Genotypen. Aufschlüsselung in Kinder der GNN- und der Neo-Studie. Teilnehmer in absoluten Zahlen. Rest prozentuale Werte.

\* definiert als „Sepsis mit Erregernachweis (early- oder late-onset)“

IVH: Intraventrikuläre Hämorrhagie, PVL: Periventrikuläre Leukomalazie, PDA: Persistierender Ductus Arteriosus, ROP: Retinopathia Praematurorum, NEC: Nekrotisierende Enterokolitis, FIP: Fokale Intestinale Perforation, BPD: Bronchopulmonale Dysplasie

#p: p-Werte des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson.

| Genotyp                    |     | rs12263698 |        |      | rs6110241 |        |        | rs6135128 |       |       | rs6481071 |        |      |
|----------------------------|-----|------------|--------|------|-----------|--------|--------|-----------|-------|-------|-----------|--------|------|
|                            |     | AA         | AG     | GG   | GG        | GA     | AA     | GG        | GA    | AA    | CC        | CT     | TT   |
| <b>GNN</b>                 | GNN | 4400       | 134    | 7    | 2873      | 1473   | 190    | 2712      | 1185  | 159   | 4526      | 170    | 9    |
|                            | Neo | 2532       | 64     | 1    | 1636      | 822    | 97     | 1645      | 737   | 89    | 2591      | 69     | 2    |
| <b>Beatmung</b>            |     | 45,7       | 49,7   | 75   | 45,3      | 46,0   | 50,0   | 45,3      | 46,3  | 51,0  | 45,6      | 48,5   | 54,5 |
|                            | p#  | 0,133      |        |      | 0,295     |        |        | 0,191     |       |       | 0,567     |        |      |
| <b>Sepsis* [%]</b>         |     | 13,5       | 12,4   | 12,5 | 13,7      | 13,3   | 13,0   | 13,9      | 13,6  | 12,9  | 13,5      | 13,2   | 0    |
|                            | p#  | 0,998      |        |      | 0,769     |        |        | 0,727     |       |       | 0,428     |        |      |
| <b>Hirnblutung [%]</b>     |     | 17,1       | 17,4   | 25,0 | 17,3      | 17,4   | 17,9   | 16,9      | 17,6  | 18,2  | 17,1      | 17,0   | 18,2 |
|                            | p#  | 0,818      |        |      | 0,962     |        |        | 0,851     |       |       | 0,993     |        |      |
| <b>IVH-Grad</b>            | 0   | 83,0       | 82,9   | 75,0 | 82,9      | 82,8   | 82,1   | 83,3      | 82,6  | 81,8  | 83,0      | 83,3   | 81,8 |
|                            | 1   | 6,9        | 6,9    | 0,0  | 7,1       | 7,1    | 8,0    | 6,9       | 6,8   | 8,1   | 7,0       | 6,6    | 0,0  |
|                            | 2   | 4,0        | 4,1    | 0,0  | 3,8       | 4,5    | 3,3    | 3,8       | 4,5   | 3,1   | 4,0       | 3,9    | 9,1  |
|                            | 3   | 2,8        | 3,7    | 12,5 | 3,0       | 2,4    | 3,3    | 2,9       | 2,4   | 3,5   | 2,8       | 3,5    | 9,1  |
|                            | 4   | 3,2        | 2,3    | 12,5 | 3,2       | 3,2    | 3,3    | 3,2       | 3,7   | 3,5   | 3,2       | 2,7    | 0,0  |
|                            | p#  | 0,554      |        |      | 0,756     |        |        | 0,672     |       |       | 0,840     |        |      |
| <b>PVL</b>                 |     | 0,0342     | 0,0321 | 0    | 0,0336    | 0,0326 | 0,0365 | 0,034     | 0,033 | 0,039 | 0,0339    | 0,0347 | 0    |
|                            | p#  | 0,856      |        |      | 0,872     |        |        | 0,878     |       |       | 0,755     |        |      |
| <b>OP PDA</b>              |     | 4,6        | 7,4    | 12,5 | 4,8       | 4,3    | 5,4    | 5,0       | 4,7   | 3,1   | 4,6       | 5,4    | 9,1  |
|                            | p#  | 0,188      |        |      | 0,444     |        |        | 0,178     |       |       | 0,553     |        |      |
| <b>OP ROP</b>              |     | 3,2        | 3,8    | 25,0 | 3,2       | 3,2    | 3,1    | 3,3       | 3,0   | 2,7   | 3,2       | 3,9    | 9,1  |
|                            | p#  | 0,001      |        |      | 0,839     |        |        | 0,574     |       |       | 0,289     |        |      |
| <b>OP NEC oder FIP [%]</b> |     | 4,0        | 6,9    | 25,0 | 4,1       | 4,0    | 4,0    | 4,2       | 4,3   | 4,3   | 4,0       | 6,2    | 27,3 |
|                            | p#  | 0,001      |        |      | 0,999     |        |        | 0,995     |       |       | 0         |        |      |
| <b>BPD</b>                 |     | 15,6       | 20,6   | 37,5 | 15,7      | 15,4   | 19,3   | 15,6      | 16,2  | 15,9  | 15,5      | 17,8   | 27,3 |
|                            | p#  | 0,034      |        |      | 0,102     |        |        | 0,980     |       |       | 0,205     |        |      |

## 7.6 Anhang 6: Häufigkeiten der Endpunkte Blutdruck und Katecholamintherapie

**Tabelle 13:** Endpunkte Blutdruck und Katecholamintherapie am ersten Lebenstag bei Frühgeborenen mit den SNPs rs12263698, rs6110241 und rs6135128

Dargestellt sind der Median und die Perzentile des mittleren arteriellen Drucks (MAP) sowie der Katecholamintherapie in Abhängigkeit von den verschiedenen Genotypausprägungen bei Frühgeborenen mit den Polymorphismen rs12263698, rs6110241 und rs6135128. Auch hier bestehen Unterschiede zwischen den homozygot häufigen und heterozygoten in Gegenüberstellung zu den homozygot seltenen. Diese sind jedoch sehr gering und vermutlich auf die vergleichsweise niedrige Fallzahl zurückzuführen.

| Genotyp   | rs12263698     |               |          | rs6110241      |                |               | rs6135128      |                |               |
|---|----------------|---------------|----------|----------------|----------------|---------------|----------------|----------------|---------------|
|   | GG             | GA            | AA       | AA             | AG             | GG            | AA             | AG             | GG            |
| <b>MAP</b><br>Median<br>minimal am<br>ersten<br>Lebenstag<br>[mmHg] | 28             | 27            | 25       | 28             | 28             | 27            | 27             | 28             | 27            |
|   | 23             | 22            | 21       | 23             | 23             | 23            | 23             | 23             | 23            |
|   | 32             | 31            | 36       | 32             | 32             | 32            | 32             | 32             | 32            |
|   | 4684           | 143           | 7        | 3020           | 1594           | 193           | 2877           | 1321           | 162           |
| <b>Katecholamine</b><br>[n/n (%)]                                   | 1386<br>/      | 45<br>/       | 0<br>/   | 887<br>/       | 467<br>/       | 72<br>/       | 875<br>/       | 404<br>/       | 59<br>/       |
|   | 7502<br>(18,5) | 214<br>(21,0) | 8<br>(0) | 4843<br>(18,3) | 2514<br>(18,6) | 296<br>(24,3) | 4703<br>(18,6) | 2144<br>(18,8) | 254<br>(23,2) |
| <b>Dopamin</b><br>[%]   | 10,8           | 13,6          | 0        | 10,7           | 10,8           | 14,3          | 10,9           | 11,2           | 15,5          |
| <b>Adrenalin</b><br>[%]   | 4,7            | 5,5           | 0        | 4,3            | 5,0            | 9,7           | 4,5            | 5,2            | 7,8           |
| <b>Noradrenalin</b><br>[%]  | 3,8            | 6,9           | 0        | 3,6            | 4,1            | 5,7           | 3,8            | 3,9            | 5,4           |
| <b>Dobutamin</b><br>[%]   | 10,1           | 10,1          | 0        | 10,0           | 9,6            | 10,3          | 10,1           | 10,4           | 9,3           |

## 8 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Zunächst möchte ich mich bei Herrn Professor Herting bedanken in seinem Institut für Kinder- und Jugendmedizin promovieren zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Göpel, der mir ein so spannendes Thema zur Verfügung stellte und mir den Zugang in die Welt der Forschung eröffnete. Dank ihm und seiner Begeisterungsfähigkeit hat mir die Arbeit an der Dissertation viel Freude bereitet.

Weiterhin möchte ich mich auch beim übrigen GNN-Team bedanken, von dem ich so herzlich aufgenommen wurde und in dem ich mich ausnahmslos sehr wohl gefühlt habe. Ich danke Anja Sewe und Sabine Ziesenitz, die mich in der Arbeit im Labor angeleitet und mir einen Platz im Labor zur Verfügung gestellt haben. Während der Dateneingabe und der Arbeit mit den statistischen Programmen war ich sehr dankbar über die liebe Hilfe von Anja Kaufmann, Irene Fischer und Sabine Brehm. Weiterhin möchte ich Bea Hatje danken, von der ich immer mit einem Lächeln begrüßt wurde.

Für die freundliche Unterstützung in der statistischen Auswertung danke ich dem Institut für medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck. Dabei möchte ich speziell Herrn Dr. Preuß meinen Dank für das geduldige Beantworten meiner zahlreichen Fragen aussprechen.

Des Weiteren danke ich dem von Professor Nürnberg geleiteten Cologne Center for Genomics der Universität zu Köln für die Durchführung der GWAS.

Außerdem möchte ich mich an dieser Stelle von ganzem Herzen bei meinen Eltern bedanken, die mich während meines Studiums und dieser Arbeit in allem bedingungslos unterstützt und alle meine Hochs und Tiefs ertragen haben. Ihr Interesse an meiner Arbeit und ihr fortwährender Optimismus haben mich sehr in meiner Arbeit bestärkt. Ohne sie hätte ich es nicht so weit geschafft. Ich danke euch!

## 9 Lebenslauf

|                     |            |
|---------------------|------------|
| <b>Name</b>         | Esselborn  |
| <b>Vorname</b>      | Hannah     |
| <b>Geburtsdatum</b> | 07.06.1990 |
| <b>Geburtsort</b>   | Cuxhaven   |

### Universitäre Ausbildung

|           |   |
|-----------|---|
| Seit 2009 | Humanmedizin an der Universität zu Lübeck   |
| 2011      | 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Gesamtnote: sehr gut 1,5)  |
| 2012-2015 | Dissertation in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Lübeck                                      |
| 2012-2014 | Wissenschaftliche Hilfskraft in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Lübeck, GNN-Studienzentrale |
| 2012/3    | Auslandssemester an der Medizinischen Universität zu Graz (Österreich)  |
| 2014      | 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Gesamtnote: befriedigend)  |
| 2015      | PJ Pädiatrietertial in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Lübeck                               |
| 2015      | 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Gesamtnote: gut 2,0)   |