

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

---

**Der Einfluss von Polymorphismen im  
Apolipoprotein E Gen auf die Entwicklung  
intraventrikulärer Hämorrhagien und neonataler  
Septitiden bei sehr kleinen Frühgeborenen**

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

vorgelegt von  
Sören Schulz  
aus Suhlendorf

Lübeck 2019

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Göpel
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Peter Trillenberg

Tag der mündlichen Prüfung: 23.6.2020

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 23.6.2020

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>1      Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1    Frühgeborene .....	1
1.2    Intraventrikuläre Hämorrhagie .....	2
1.3    Neonatale Sepsis .....	4
1.4    Apolipoprotein E.....	5
1.4.1    Genetische Grundlage von Apo E.....	5
1.4.2    Physiologische Funktion von Apo E .....	6
1.4.3    Auswirkung von Apo E auf physiologische und pathologische Abläufe im ZNS .	8
1.4.4    Apo E und Hirnblutungen.....	9
1.4.5    Apo E und inflammatorische Prozesse .....	10
1.5    Fragestellung.....	12
<b>2      Material und Methoden .....</b>	<b>13</b>
2.1    GNN-Studie .....	13
2.2    Definition der Endpunkte.....	15
2.3    DNA-Isolierung .....	16
2.4    Allelische Diskriminierung.....	17
2.5    Statistische Auswertung.....	21
<b>3      Ergebnisse.....</b>	<b>22</b>
3.1    Studienpopulation .....	22
3.2    Ergebnisse der allelischen Diskriminierung .....	23
3.3    Verteilung der Apo E Haplotypen, Allele und Genotypen.....	24
3.4    Klinische Daten in Bezug auf den Apo E Genotyp .....	26
3.5    IVH .....	27
3.5.1    Einfluss des Apo E Genotyps auf die IVH und PVL.....	27
3.5.2    Risikofaktoren für eine IVH .....	30
3.5.3    Einfluss von antenataler Steroidgabe und Apo E Genotyp auf die IVH.....	32
3.6    Zusammenhang von Sepsis und Apo E Genotyp.....	33
<b>4      Diskussion .....</b>	<b>35</b>
4.1    Verteilung der Apo E Allele .....	36
4.2    Klinische Daten in Bezug auf den Apo E Genotyp .....	39
4.3    IVH .....	40
4.3.1    Einfluss des Apo E Genotyps auf die IVH .....	40

4.3.2	Einfluss des Apo E Genotyps auf die PVL.....	45
4.3.3	Risikofaktoren für eine IVH .....	46
4.3.4	Einfluss von antenataler Steroidgabe und Apo E Genotyp auf die IVH.....	48
4.4	Zusammenhang von Sepsis und Apo E Genotyp.....	50
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick .....	53
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>55</b>
<b>A</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>75</b>
A.1	Einverständniserklärung der Eltern .....	75
A.2	Dokumentationsbogen 1 der GNN-Studie .....	76
A.3	Dokumentationsbogen 2 der GNN-Studie .....	77
A.4	Dokumentationsbogen 3 der GNN-Studie .....	78
A.5	Dokumentationsbogen 4 der GNN-Studie .....	79
A.6	Protokoll zur DNA-Isolierung aus Mundschleimhaut-Abstrichen .....	80
A.7	Protokoll zur DNA-Isolierung aus Nabelschnüren .....	82
A.8	Tabelle zur logistischen Regression klinischer Risikofaktoren der IVH.....	84
	<b>Danksagung.....</b>	<b>85</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>86</b>

# **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Darstellung der drei Apo E Varianten .....	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung der allelischen Diskriminierung (nach Thermo Fisher Scientific, 2010).....	19
Abbildung 3: Cluster Plot zur allelischen Diskriminierung .....	20
Abbildung 4: Einschluss der Frühgeborenen aus dem GNN in die vorliegende Arbeit.....	22
Abbildung 5: IVH Grad 3/4 in Abhängigkeit von der Anzahl der Apo E-Polymorphismen .....	28
Abbildung 6: Verteilung der IVH-Grade in Bezug auf alle Hirnblutungen in der Kohorte	29
Abbildung 7: Verteilung der IVH-Grade in Abhängigkeit vom Apo E Genotyp .....	30
Abbildung 8: ORs der klinischen Risikofaktoren für eine schwere IVH .....	31
Abbildung 9: IVH Grad 3/4 in Abhängigkeit von antenataler Steroidgabe und Apo E Genotyp.....	32

# **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Protokoll PCR-Reagenzien.....	17
Tabelle 2: Protokoll PCR-Ablauf .....	18
Tabelle 3: Ergebnisse der allelischen Diskriminierung .....	23
Tabelle 4: Verteilung der Apo E Haplotypen.....	24
Tabelle 5: Bildung der Apo E Genotypen aus den Apo E Haplotypen .....	24
Tabelle 6: Verteilung der Apo E Allele bezogen auf die Herkunft der Mütter .....	25
Tabelle 7: Klinische Daten in Abhängigkeit vom Apo E Genotyp .....	26
Tabelle 8: IVH und PVL in Abhängigkeit vom Apo E Genotyp .....	27
Tabelle 9: Sepsis in Abhängigkeit vom Apo E Genotyp.....	34
Tabelle 10: Logistische Regression der klinischen Risikofaktoren für eine schwere IVH .	84

# Abkürzungsverzeichnis

Apgar	Score zur Beurteilung des klinischen Zustands des Neugeborenen nach der Geburt
Apo	Apolipoprotein
ARR	Absolute Risikoreduktion
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
C	Cytosin
CP	Cerebralparese
DNA	Deoxyribonucleic acid
E. coli	Escherichia coli
ELBW	Extremely-Low-Birth-Weight (< 1000g)
EOS	Early-onset-Sepsis
GA	Gestationsalter
GG	Geburtsgewicht
GNN	German Neonatal Network, Deutsches Frühgeborenen-Netzwerk
HDL	High-Density-Lipoprotein
IL	Interleukin
IVH	Intraventrikuläre Hämorrhagie
IZB	Intrazerebrale Blutung
KI	Konfidenzintervall, in der vorliegenden Arbeit immer das 95 %-Konfidenzintervall
KIGGS	Kinder- und Jugendgesundheitssurvey, Studie zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland
LBW	Low-Birth-Weight (< 2500g)
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LOS	Late-onset-Sepsis
LPS	Lipopolysaccharid
MRT	Magnetresonanztomographie
OR	Odds Ratio
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PVL	Periventrikuläre Leukomalazie
RNA	Ribonucleic acid
SGA	Small for gestational age
SNP	Single nucleotide polymorphism
SSW	Schwangerschaftswoche
Staph. epi.	Staphylococcus epidermidis

T	Thymin
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
VLBW	Very-Low-Birth-Weight (< 1500g)
VLDL	Very-Low-Density-Lipoprotein
Vs.	Versus
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Frühgeborene

Nach allgemein anerkannter Definition der World Health Organization bedeutet Frühgeburtlichkeit eine Geburt vor der abgeschlossenen 37. Schwangerschaftswoche (SSW). Weltweit kommen 11,1 % aller Kinder als Frühgeborene zur Welt, wobei ausgehend vom Geburtsgewicht (GG) eine weitere Unterteilung in Low-Birth-Weight (LBW, GG < 2500g), Very-Low-Birth-Weight (VLBW, GG < 1500g) und Extremely-Low-Birth-Weight (ELBW, GG < 1000g) erfolgen kann (Blencowe et al., 2012; Speer, 2013).

Die Frühgeburten-Raten weisen im weltweiten Vergleich deutliche Unterschiede auf. So zeigen Länder mit niedrigem Einkommen höhere Frühgeburten-Raten als Länder mit hohem Einkommen. In einigen afrikanischen Ländern wie Malawi sind sie mit 18 % beispielsweise sehr hoch, während sie in mehreren Ländern Europas bei circa 5 % liegen (Blencowe et al., 2012). Deutschland zeigt dabei innerhalb Europas mit 8,9 % einen vergleichsweise hohen Anteil Frühgeborener (Statistisches Bundesamt, 2015).

Global betrachtet nimmt der Anteil Frühgeborener zu (Blencowe et al., 2012). Die Ursachen dafür liegen in einem Trend zu höherem mütterlichem Alter bei Geburt, einer höheren Anzahl von Infertilitätsbehandlungen und einer Zunahme an Mehrfachgeburten sowie mütterlichen Erkrankungen wie Hypertonie und Diabetes (Howson et al., 2013). In Deutschland ist die Frühgeburten-Rate jedoch innerhalb der letzten Jahre stabil geblieben, obwohl es auch hier zu einer Zunahme sehr kleiner und unreifer Frühgeborener kommt (Schleußner, 2013).

Frühgeburtlichkeit stellt die Haupttodesursache bei Neugeborenen dar. Jährlich sterben weltweit eine Million Kinder auf Grund von Frühgeburtlichkeit, und auch innerhalb der ersten fünf Lebensjahre bleibt sie die häufigste Ursache kindlicher Mortalität (Liu et al., 2016). Darüber hinaus begünstigt Frühgeburtlichkeit die Entstehung weiterer Krankheiten wie Infektionen, bronchopulmonale Dysplasien (BPD) oder intraventrikuläre Hämorrhagien (IVH; Allen, 2013).

Zudem ist die Entwicklung des Zentralen Nervensystems (ZNS) erheblich beeinträchtigt, da sie vor allem im dritten Trimenon stattfindet (Hüppi et al., 1998). So zeigen Frühgeborene strukturelle ZNS-Veränderungen wie ein geringeres Hirnvolumen (de Kieviet et al., 2012)

und eine verzögerte Ausreifung von Neuronen und Oligodendrozyten (Salmaso et al., 2014). Dies wird von beeinträchtigten kognitiven und motorischen Fähigkeiten sowie von Verhaltensauffälligkeiten begleitet. Zudem weisen Frühgeborene häufiger Entwicklungsverzögerungen sowie eine höhere Anfälligkeit für Erkrankungen des ZNS wie Cerebralparese (CP) auf (Aarnoudse-Moens et al., 2009; Johnson und Marlow, 2017). Frühgeborene sind somit eine Risikopopulation. Zwar konnte durch die verbesserte Versorgung in der Neonatologie die Häufigkeit einer Vielzahl an Krankheiten wie BPD oder Infektionen gesenkt (Allen, 2013) und ein kontinuierlicher Rückgang der Sterblichkeit in der Neonatalperiode über die letzten mehr als 60 Jahre beobachtet werden (Murphy et al., 2017). Dennoch kommen durch die Zunahme sehr unreifer Frühgeborener immer mehr Kinder zur Welt, die eine hohe Mortalität und Morbidität zeigen. So überleben mehr Frühgeborene mit einem besonders hohen Risiko für die Entwicklung einer IVH (Mukerji et al., 2015). In Folge dessen zeigt die IVH in kürzerer Vergangenheit – je nach betrachteter Studie – unveränderte Häufigkeiten oder zumindest nur einen leichten Rückgang (Inder et al., 2018).

## 1.2 Intraventrikuläre Hämorrhagie

Die IVH ist die typische Hirnblutung Frühgeborener (Speer, 2013) mit einer Häufigkeit von 20 % unter VLBW-Frühgeborenen (Robinson, 2012; Szpecht et al., 2015; Wei et al., 2016). Sie stellt dabei eine Einblutung in die germinale Matrix dar. Bei der germinalen Matrix handelt es sich um ein zellreiches, gut vaskularisiertes Areal zwischen Nucleus caudatus und Thalamus auf Höhe des Foramen Monroe, aus dem während der fetalen Entwicklung des ZNS Neuronen und Gliazellen in das restliche Gehirn migrieren (Mukerji et al., 2015). Die germinale Matrix bildet sich dabei ab der 28. SSW kontinuierlich zurück (Perlman, 2009). Diese Rückbildung ist schätzungsweise in der 36. SSW abgeschlossen und die germinale Matrix damit bei Reifgeborenen nicht mehr vorhanden (Szymonowicz et al., 1984).

Die Blutgefäße der germinalen Matrix sind besonders fragil (Milligan, 1980). Es handelt sich um irreguläre Gefäße, die weder typische Charakteristika von Arteriolen noch von Venolen aufweisen und eher als persistierendes, unreifes Gefäßnetz bezeichnet werden können (Inder et al., 2018). Veränderungen im zerebralen Blutfluss können deshalb zur Ruptur dieser Gefäße führen. Dabei kommt pathophysiologisch sowohl eine Hyperperfusion mit konsekutiver mechanischer Ruptur als auch eine verminderte Perfusion mit ischämischer Läsion der Gefäße in Frage (Speer, 2013). Dies wird insbesondere bei unreifen

Frühgeborenen dadurch gefördert, dass die Autoregulation des zerebralen Blutflusses weniger gut funktioniert (Milligan, 1980). Darüber hinaus spielt bei der Entstehung einer IVH auch eine Drucksteigerung im venösen System eine Rolle, wie sie unter anderem bei beatmeten Kindern oder im Falle eines Pneumothorax auftritt (Robinson, 2012; Speer, 2013).

IVHs werden in vier Schweregrade unterteilt (siehe 2.2 Definition der Endpunkte). Grad 1 und 2 werden dabei als leichte IVH bezeichnet, während Grad 3 und 4 eine schwere IVH darstellen.

Die Mortalität ist insbesondere bei einer schweren IVH erhöht. Sie beträgt hier das sechsfache im Vergleich zu Kindern ohne IVH (Mukerji et al., 2015). Als Folge der Blutung kann zudem ein Hydrozephalus auftreten (Murphy, 2007), während langfristig die neurologische Entwicklung beeinträchtigt ist und auch neurologische Folgeerkrankungen wie eine CP gehäuft vorkommen (Ancel et al., 2006; Mukerji et al., 2015).

Die IVH wird als multifaktorielle Erkrankung sowohl von genetischen Faktoren als auch von Umweltfaktoren beeinflusst (McCrea und Ment, 2008; Ment et al., 2015). In zahlreichen Studien stellten sich unter anderem das männliche Geschlecht, ein niedriges GA, ein niedriger Apgar, eine invasive Beatmung, ein Pneumothorax und ein Mehrlingsstatus als Risikofaktoren heraus. Im Gegensatz dazu wirken eine antenatale Steroidgabe, eine weiße Hautfarbe sowie eine Geburt als small for gestational age (SGA) protektiv (Singh et al., 2013; Shankaran et al., 2014; Ment et al., 2015; Waitz et al., 2016). SGA bedeutet hierbei ein GG unterhalb der zehnten Perzentile des erwarteten GG (Voigt et al., 2012). Die Kenntnis solcher Risikofaktoren macht eine bessere Versorgung in der Neonatologie möglich. So konnte in Kalifornien eine Reduktion der Inzidenz der IVH beobachtet werden, die vor allem auf eine verminderte Intubation im Kreissaal sowie einen vermehrten Gebrauch antenataler Steroide zurückzuführen ist (Handley et al., 2018).

Im Gegensatz dazu gelang es trotz zahlreicher Versuche nicht, medikamentöse Interventionen zur Beeinflussung der IVH zu etablieren (Roberts et al., 2017b).

*Für die vorliegende Doktorarbeit tritt dabei folgende Fragestellung auf:  
Lassen sich die bekannten Risikofaktoren für eine IVH in unserer Kohorte bestätigen?*

## 1.3 Neonatale Sepsis

Bei der Sepsis handelt es sich um eine lebensbedrohliche Erkrankung auf Grundlage einer fehlgeleiteten Immunantwort auf eine Infektion.

Pathophysiologisch kommt es dabei zunächst zu einer überschießenden Immunreaktion. Darauf folgt eine Phase der Immunsuppression, die von Gerinnungsaktivierung, Gefäßdilatation und in Folge dessen Mikrozirkulationsstörungen begleitet wird. Im finalen Stadium kann es dadurch zu massiven Organdysfunktionen mit hoher Letalität kommen. In der Anfangsphase der Sepsis werden insbesondere von Makrophagen und Monozyten proinflammatorische Zytokine freigesetzt, zu denen Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) und Interleukin 1 $\beta$  (IL 1 $\beta$ ) zählen. Sekundär steigen dann die Konzentrationen von IL 6, IL 8 und anderen Zytokinen, die zu einer generalisierten Immunantwort führen (Bhan et al., 2016). Verschiedenen Endotoxine und Exotoxine können diese Zytokinausschüttung triggern. Dazu zählen beispielsweise auch Lipopolysaccharide (LPS) aus der Zellwand gram-negativer Bakterien. Sie bewirken dies über eine Bindung an Toll-like-Rezeptoren der Makrophagen und Monozyten (Lewis et al., 2016).

Bei der neonatalen Sepsis wird in Abhängigkeit des Zeitpunktes zwischen Early-Onset-Sepsis (EOS) und Late-Onset-Sepsis (LOS) unterschieden. Die EOS tritt per Definition innerhalb der ersten 72 Stunden nach Geburt auf, die LOS danach.

Es zeigt sich dabei ein unterschiedliches Erregerspektrum. Bei der EOS wird es von Erregern aus der mütterlichen Vaginalflora dominiert, insbesondere von Streptokokken der Gruppe B und *E. coli* (Schrag et al., 2016). Hingegen dienen bei der LOS beispielsweise Gefäßkatheter oder Beatmungstuben als Eintrittspforten und es treten damit andere Erreger wie koagulasenegative Staphylokokken, *Staphylococcus aureus* oder Enterobakterien auf (Dong und Speer, 2015).

Die EOS tritt in Ländern mit hohem medizinischen Versorgungsstandard in 0,08 % aller Lebendgeborenen auf (Schrag et al., 2016). Die LOS tritt hingegen in 0,6 % aller Lebendgeborenen und damit deutlich häufiger auf (Didier et al., 2012).

## 1.4 Apolipoprotein E

### 1.4.1 Genetische Grundlage von Apo E

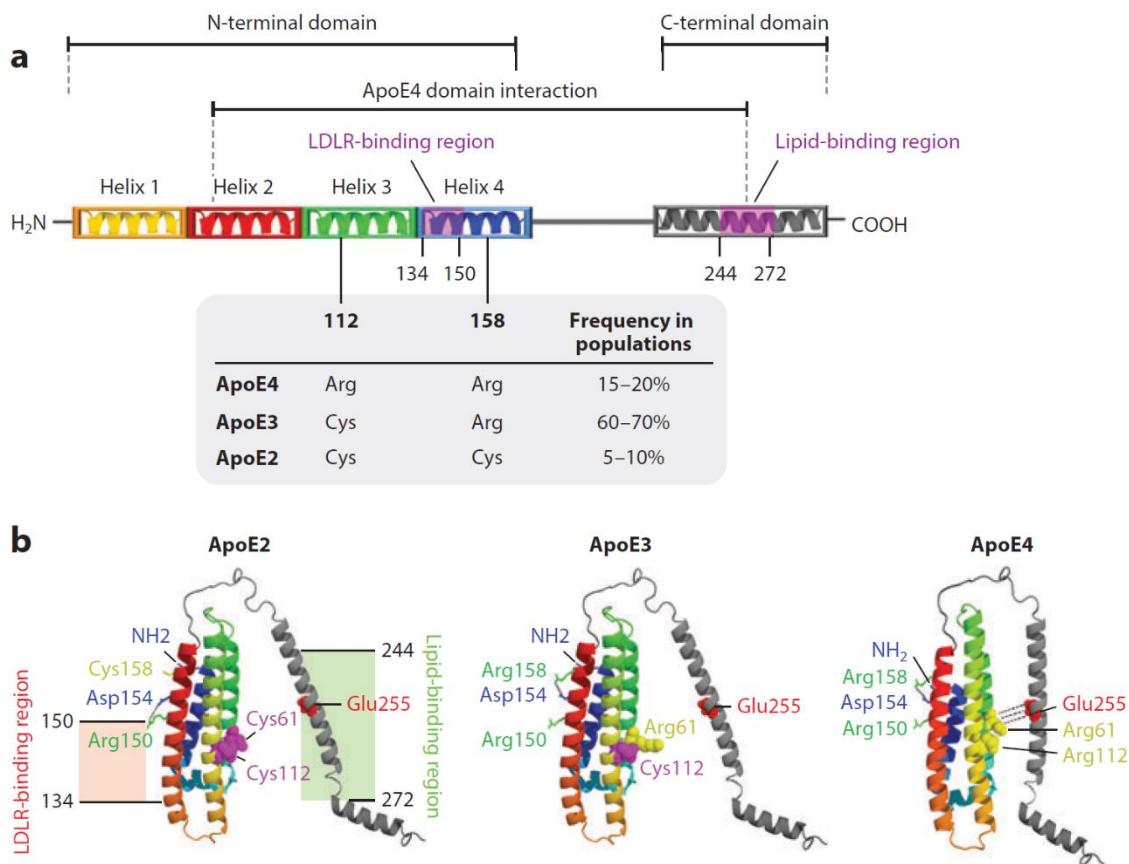
Apolipoprotein E (Apo E) ist ein 299 Aminosäuren langes Protein, dessen Gen auf Chromosom 19 liegt (Giau et al., 2015). Das Apo E -Gen besitzt drei wesentliche Allele: Apo E2, Apo E3 und Apo E4 (Koch et al., 2002). Daneben sind selteneren Genvarianten wie Apo E1, Apo E3r und Apo E5 bekannt (Ordovas et al., 1987; Seripa et al., 2011). Die drei relevanten Apo E Allele sind lediglich auf zwei Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) zurückzuführen (Seripa et al., 2011). SNPs bezeichnen Genvarianten, die sich nur in einer Nukleinbase unterscheiden, wobei die Häufigkeit für das seltene Allel über 1 % beträgt (Wang et al., 1998). Diese SNPs stellen den Großteil der interindividuellen genetischen Unterschiede bei Menschen dar und haben in den letzten Jahrzehnten zunehmendes Interesse im Rahmen genetischer Untersuchungen erlangt (Edwards et al., 2013).

Die SNPs im Apo E-Gen betreffen die Positionen 3 937 und 4 075, an denen entweder Thymin (T) oder Cytosin (C) vorliegt. Die seltenen Allele Apo E2 und Apo E4 weisen dabei jeweils nur eine ausgetauschte Nukleinbase im Vergleich zum häufigen Allel Apo E3 auf (Seripa et al., 2011). Das hat im entstehenden Protein den Ersatz einer Aminosäure an den Positionen 112 oder 158 zur Folge (Abbildung 1, Yu et al., 2014).

Trotz dieser nur geringen Unterschiede zwischen den drei Allelen haben sie folgenschwere Konsequenzen. So zeigen Träger von zwei Apo E4 Allelen ein 15-fach erhöhtes Risiko an Alzheimer zu erkranken. Zudem führt Apo E4 zu einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (Eichner et al., 2002). Apo E2 ist hingegen mit einem erhöhten Risiko verbunden, an einer Hyperlipoproteinämie Typ 3 zu erkranken (Phillips, 2014).

Ausgehend von den drei möglichen Allelen ergeben sich sechs Haplotypen und davon abgeleitet drei Genotypen (siehe 3.3 Verteilung der Apo E Haplotypen, Allele und Genotypen).

Die drei Allele zeigen dabei in Europa eine Verteilung von 7 % für Apo E2, 78 % für Apo E3 und 15 % für Apo E4. Die weltweite Verteilung weist insgesamt eine starke Variation auf (Corbo und Scacchi, 1999). Zudem zeigt die Verteilung Unterschiede in Abhängigkeit vom Alter. Neugeborene zeigen einen höheren Anteil an Apo E4 auf Kosten von Apo E3, während dieser Anteil mit zunehmendem Lebensalter abnimmt und sich Apo E4 als Risikofaktor für eine kürzere Lebensdauer erweist (Schächter et al., 1994; Becher et al., 2005; Payami et al., 2005).



*Abbildung 1: Darstellung der drei Apo E Varianten*

Es lässt sich erkennen, wie der Austausch der Aminosäuren an Position 112 oder 158 zur Entstehung dreier unterschiedlicher Proteine führt (Yu et al., 2014).

### 1.4.2 Physiologische Funktion von Apo E

Um Lipide in hydrophilen Milieus wie dem Blut zu transportieren, müssen sie in Strukturen mit hydrophiler Hülle verpackt werden. Diese Funktion übernehmen im menschlichen Körper die Lipoproteine. Zu ihnen zählen Chylomikronen, Very-Low-Density-Lipoproteine (VLDL), Low-Density-Lipoproteine (LDL) und High-Density-Lipoproteine (HDL, Han, 2004). Sie beinhalten in ihrem hydrophoben Kern Triglyzeride und Cholesterolester und sind von einer hydrophilen Hülle umgeben, die von Phospholipiden und Apolipoproteinen gebildet wird (Eichner et al., 2002). Die verschiedenen Lipoproteine unterscheiden sich funktionell darin, welche Lipide sie transportieren und worin ihre Ausgangs- und Zielorgane bestehen. Um diese unterschiedlichen Funktionen zu erfüllen, sind sie verschieden aufgebaut. Dabei besitzt jedes Lipoprotein eine spezifische Zusammensetzung von Apolipoproteinen. Diese erfüllen in Lipoproteinen neben der Bildung der hydrophilen Hülle außerdem die Funktion, dass sie Kofaktoren für bestimmte

Enzyme darstellen sowie einen gezielten Transport zu Organen ermöglichen, indem sie an Oberflächenrezeptoren der Zielzellen binden (Han, 2004).

Apo E wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert. Daneben erfolgt seine Bildung in zahlreichen anderen Organen wie der Milz, der Niere, den Gonaden und in Makrophagen. Der zweithäufigste Syntheseort ist jedoch das Gehirn (Eichner et al., 2002). Apo E ist in Chylomikronen, VLDL und HDL enthalten und sorgt für den zielgerichteten Transport von Phospholipiden, Cholesterolestern, Cholesterin und Triglyceriden (Giau et al., 2015).

Insbesondere die Beteiligung am Transport der Triglyzeride wurde ausführlich untersucht. Zwei Lipoproteine sind besonders triglyzeridreich: In Chylomikronen werden Triglyzeride aus dem Darm zur Leber transportiert, während sie in VLDL aus der Leber in die Peripherie gebracht werden. Chylomikronen werden auf ihrem Weg aus dem Darm in die Leber von der Lipoproteinlipase gespalten. Durch Kontakt mit HDL werden sie anschließend mit Apo E angereichert und binden via Apo E an das LDL-Rezeptor-Related-Protein 1 und an den LDL-Rezeptor auf den Hepatozyten.

Nach Internalisierung werden die Bestandteile getrennt: Während Lipide und andere Bestandteile in Lysosomen abgebaut werden, wird Apo E in frühen Endosomen angereichert. Zudem wird Cholesterin aus zellulären Kompartimenten mobilisiert und ebenfalls in die frühen Endosomen aufgenommen. HDL oder von HDL stammendes Apo A1 gelangt im nächsten Schritt in den Hepatozyten und veranlasst eine Sekretion der frühen Endosomen. Die sezernierten Bestandteile sind daraufhin an der Bildung von HDL beteiligt. Das Recycling führt somit einerseits zur Bereitstellung von HDL und zum Efflux von Cholesterin aus Hepatozyten, andererseits werden Triglyzeride insbesondere postprandial innerhalb der Chylomikronen aus der Blutbahn entfernt (Heeren et al., 2006; Phillips, 2014). VLDL wird auf ähnliche Weise wie Chylomikronen abgebaut, allerdings wird es teilweise auch zu LDL metabolisiert (Phillips, 2014).

Als Bestandteil von HDL ist Apo E zudem am reversen Cholesterol-Transport aus peripheren Geweben zur Leber beteiligt (Kockx et al., 2018).

### **1.4.3 Auswirkung von Apo E auf physiologische und pathologische Abläufe im ZNS**

Das im Gehirn vorhandene Apo E wird vollständig innerhalb des ZNS synthetisiert, während in der Peripherie zirkulierendes Apo E die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann (Hauser et al., 2011). Im Gehirn als zweithäufigstem Syntheseort wird Apo E vor allem in Astrozyten und Mikroglia sowie unter Stress zusätzlich in Neuronen gebildet (Xu et al., 2006). Apo E ist das vorherrschende Apolipoprotein im ZNS (Holtzman et al., 2012). Es spielt eine wesentliche Rolle in der zentralnervösen Verteilung von Lipiden und Cholesterol und ist damit entscheidend an axonalem Wachstum sowie an der Synthese von Synapsen, Membranen und Myelinscheiden beteiligt (Lien et al., 2015).

Im Rahmen von Reparaturprozessen wird die Apo E Synthese im ZNS auf das 150-fache gesteigert (Snipes et al., 1986) und trägt so über den Transport von Lipiden zur Reparatur von Membranen bei. Apo E4 wird allerdings im Rahmen dieser Prozesse intrazellulär vermehrt zu neurotoxischen Fragmenten abgebaut, die Schäden an Mitochondrien und am Zytoskelett verursachen. Es ist somit weniger effektiv an der Reparatur beschädigter Zellen beteiligt (Mahley und Huang, 2012).

Auch in anderen Prozessen im ZNS lassen sich erhebliche Unterschiede zwischen den Apo E Genotypen feststellen, wobei Apo E4 im Vergleich zu Apo E3 zahlreiche schädliche Effekte zeigt. Während Apo E3 im ZNS eine anti-inflammatoryische und anti-apoptotische Komponente besitzt, verstärkt Apo E4 inflammatorye Prozesse und zeigt eine erhöhte Apoptoserate in Neuronen. Zudem weist Apo E4 ein beeinträchtigtes axonales Wachstum, eine beeinträchtigte Aussprössung von Neuriten sowie eine beeinträchtigte Synapsensynthese auf. Darüber hinaus ist Apo E4 mit einem veränderten Membranpotential sowie einem beeinträchtigten Glucose-Metabolismus assoziiert (Mahley et al., 2006; Vance und Hayashi, 2010; Mahley und Huang, 2012).

Unterschiede zwischen den Apo E Polymorphismen haben zudem einen Einfluss auf die Entwicklung und den Verlauf zahlreicher Erkrankungen des ZNS.

Neben dem bereits beschriebenen Einfluss auf die Entwicklung einer Alzheimer-Erkrankung (Phillips, 2014) ist Apo E4 mit einem schlechteren Outcome nach traumatischen Hirnschäden assoziiert (Zhou et al., 2008; Zeng et al., 2014). Des Weiteren zeigt sich auch bei Kindern ein Einfluss von Apo E auf das Gehirn sowie auf Erkrankungen des ZNS, auch wenn diese Zusammenhänge noch nicht vollständig geklärt sind. So soll Apo E4 bei Kindern ebenfalls mit einem schlechteren neurologischen Outcome nach traumatischem Hirnschaden assoziiert sein (Kurowski et al., 2012; Kassam et al., 2016). Bei Kindern, die an angeborenen

Herzfehlern operiert wurden, zeigte sich hingegen der Apo E2 Genotyp als Risikofaktor für ein schlechteres Outcome (Gaynor et al., 2003; Gaynor et al., 2014). Und im Rahmen einer CP konnten einerseits sowohl der Apo E2 als auch der Apo E4 Genotyp mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko in Verbindung gebracht werden (Kuroda et al., 2007; Braga et al., 2009). Andererseits wirkt sich Apo E4 negativ auf den Verlauf der Erkrankung aus, wie Lien et al. zeigen konnten. Sie berichteten, dass Apo E4 häufiger zu Epilepsie und parenteraler Ernährung führt (Lien et al., 2013).

In einigen Studien wurde allerdings auch ein positiver Einfluss von Apo E4 angegeben. So berichteten einige Autoren von einer besseren neurokognitiven Entwicklung gesunder Kinder mit Apo E4 Genotyp (Wright et al., 2003; Blackman et al., 2005; Oriá et al., 2005). Blackman et al. vermuteten, dass sich Apo E4 im fortgeschrittenen Lebensalter schädlich auswirke, bei Kindern hingegen einen gegensätzlichen, protektiven Effekt zeige (Blackman et al., 2005). Diese Vermutung konnte jedoch in einer Metaanalyse von Ihle et al. an 11 098 Kindern nicht bestätigt werden. Hier zeigte sich keine Auswirkung des Apo E Genotyps auf die neurokognitive Entwicklung (Ihle et al., 2012).

#### **1.4.4 Apo E und Hirnblutungen**

Bei Erwachsenen wird die Erblichkeit des Risikos für intrazerebrale Blutungen (IZBs) auf 44 % geschätzt (Carpenter et al., 2016). Apo E hat dabei den größten Einfluss auf dieses genetische Risiko (Devan et al., 2013). Zahlreiche Studien konnten Apo E2 und Apo E4 als Risikofaktoren für IZBs identifizieren. Die Studien unterschieden dabei teilweise zwischen lobären und nicht-lobären Blutungen und es zeigten sich je nach Blutungstyp verschiedene Ergebnisse.

So fanden Peck et al. an 4 907 Patienten ein erhöhtes Risiko für lobäre IZBs bei Apo E2 und Apo E4 (Peck et al., 2008). Biffi et al. bestätigten einen Einfluss beider Genotypen auf die Entwicklung einer lobären IZB an 6 230 Individuen (Biffi et al., 2010). Hingegen wiesen Sudlow et al. in einer großen Kohorte von 23 926 Patienten nur Apo E2 als Risikofaktor für lobäre IZBs aus (Sudlow et al., 2006). Zwei weitere Studien stellten dagegen ein erhöhtes Risiko für lobäre IZBs bei Trägern des Apo E4 Genotyps fest (Zhang et al., 2014; Chen und Hu, 2016). Des Weiteren berichteten Biffi et al. von einem erhöhten Risiko für nicht-lobäre IZBs bei Apo E4 (Biffi et al., 2010).

Eine Studie an 2 015 Individuen zeigte, dass der Apo E Genotyp außerdem einen Einfluss auf den langfristigen Verlauf nach einer Hirnblutung bei Erwachsenen hat. Apo E2 Träger

zeigten durchschnittlich ein 5,3 ml höheres Blutvolumen, eine erhöhte Mortalität und ein schlechteres Outcome 90 Tage nach einer lobären IZB (Biffi et al., 2011).

Wie sich Apo E hingegen auf IVHs bei Frühgeborenen auswirkt, ist bislang nicht klar. Die genetische Beeinflussung der IVH wurde von Ådén et al. untersucht, aber nur die Methylentetrahydrofolatreduktase zeigte einen Einfluss auf die Entstehung einer IVH (Ådén et al., 2013). Allerdings soll der Einfluss von Umweltfaktoren und genetischen Faktoren bei der IVH circa 43 % betragen (Bhandari et al., 2006). Apo E erscheint dabei als aussichtsreicher Kandidat, denn einerseits ist es ein Einflussfaktor von Hirnblutungen bei Erwachsenen, andererseits hat es zahlreiche schädigende Effekte auf das Gehirn von Kindern.

*Daraus resultiert folgende Fragestellung:*

*Hat der Apo E Genotyp einen Einfluss auf die Entwicklung und den Schweregrad einer IVH bei Frühgeborenen?*

#### **1.4.5 Apo E und inflammatorische Prozesse**

Die Grundlage der Untersuchungen zu Apo E und Sepsis in dieser Doktorarbeit stellt eine Studie von Gale et al. dar. Sie zeigte den Einfluss des Apo E Genotyps auf die Inflammation sowohl an menschlichem Blut als auch direkt an Menschen nach LPS-Injektionen und untersuchte den Einfluss von Apo E zudem im Rattenmodell sowie bei Patienten mit Sepsis. Gale et al. stimulierten Blut von gesunden Probanden mit Liganden von Toll-like-Rezeptoren und stellten erhöhte Sekretionen von TNF  $\alpha$  und weiteren proinflammatorischen Zytokinen bei Trägern des Apo E4 Genotyps fest. Nach der intravenösen Injektion von LPS zeigten sich bei Apo E4 Trägern eine stärker ausgeprägte Hyperthermie, höhere TNF  $\alpha$ -Spiegel sowie ein früherer – jedoch nicht signifikanter – Anstieg von IL 6. Des Weiteren wiesen Mäuse, bei denen humanes Apo E4 ins Genom integriert wurde, eine verstärkte Hypothermie, eine erhöhte Ausschüttung von Zytokinen wie TNF  $\alpha$  sowie häufiger Leberschäden als Mäuse mit Apo E3 auf. Bei Untersuchung einer Gruppe von Patienten mit schwerer Sepsis konnte Apo E4 zwar mit einem vermehrten Auftreten von Gerinnungsstörungen assoziiert werden, insgesamt zeigte sich jedoch in den meisten untersuchten Aspekten kein signifikanter Zusammenhang und die Autoren schlussfolgerten, dass Apo E Polymorphismen das Outcome bei schwerer Sepsis nicht bedeutend beeinflussen (Gale et al., 2014).

Der Zusammenhang zwischen Apo E und inflammatorischen Prozessen wurde ausführlich untersucht. So bindet Apo E LPS und transportiert es anschließend zur Leber, wo es abgebaut wird (Van Oosten et al., 2001). Zudem unterdrückt es die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie TNF  $\alpha$ , Interferon  $\gamma$  sowie IL 6 (Ali et al., 2005) und induziert eine Konversion von proinflammatorischen zu anti-inflammatorischen Makrophagen (Baitsch et al., 2011). Neben der Hemmung inflammatorischer Prozesse bindet Apo E allerdings auch fettreiche Antigene und induziert eine Aufnahme in dendritische Zellen oder auch B-Zellen, wo sie anschließend natürlichen Killer-T-Zellen präsentiert werden und so eine Immunantwort ausgelöst werden kann (van den Elzen et al., 2005; Allan et al., 2009).

Eine entscheidende Beteiligung von Apo E an immunologischen Prozessen zeigen zudem Untersuchungen an Mäuse, denen das Apo E-Gen fehlt. Sie sind schlechter in der Lage, bakterielle Infektionen von Klebsiella pneumoniae und Listeria monocytogenes zu bekämpfen und weisen hierbei im Vergleich zu Mäusen mit Apo E eine erhöhte Mortalität auf (Roselaar und Daugherty, 1998; de Bont et al., 2000).

Zwischen den Apo E Genotypen zeigen sich – ähnlich der Ausgangsstudie von Gale et al. – deutliche Unterschiede im Hinblick auf ihre inflammatorischen Einflüsse. Mäuse mit humanem Apo E4 zeigen nach LPS-Gabe sowohl im Serum als auch im Gehirn höhere TNF  $\alpha$ - und IL 6-Spiegel (Lynch et al., 2003; Tsoi et al., 2007). Zudem weisen sie eine erhöhte Mortalität im Rahmen inflammatorischer Prozesse auf (Wang et al., 2009).

Apo E beeinflusst außerdem Infektionen beim Menschen. So erhöht Apo E4 das Risiko von Infektionen mit Herpes-simplex-Viren (Dobson et al., 2006) und humanen Immundefizienz-Viren (Burt et al., 2008), während gegenüber Infektionen mit Hepatitis C-Viren ein protektiver Effekt besteht (Price et al., 2006).

Studien zur Auswirkung von Apo E auf die Entwicklung einer Sepsis beim Menschen gibt es hingegen wenige. Moretti et al. zeigten an 343 chirurgischen Patienten, dass Apo E3 Träger signifikant seltener eine schwere Sepsis entwickelten (Moretti et al., 2005). Zudem wiesen Drabe et al. eine erhöhte systemische Inflammation bei Apo E4 Trägern nach kardiopulmonalem Bypass nach (Drabe et al., 2001).

Bei Kindern liegen noch keine Studien vor, die den Einfluss von Apo E auf inflammatorische Prozesse untersuchen.

*Es ergibt sich somit folgende Fragestellung:  
Beeinflusst der Apo E Genotyp die Häufigkeit des Auftretens einer neonatalen Sepsis?*

## 1.5 Fragestellung

- Lassen sich die bekannten Risikofaktoren für eine IVH in unserer Kohorte bestätigen?
- Hat der Apo E Genotyp einen Einfluss auf die Entwicklung und den Schweregrad einer IVH bei Frühgeborenen?
- Beeinflusst der Apo E Genotyp die Häufigkeit des Auftretens einer neonatalen Sepsis?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 GNN-Studie**

Das German Neonatal Network (GNN) – Deutsches Frühgeborenen Netzwerk – ist eine prospektive Kohortenstudie, die seit Januar 2009 deutschlandweit an 53 teilnehmenden neonatologischen Zentren klinische Daten über Frühgeborene mit einem GG unter 1500 Gramm erhebt. Nur in Ausnahmefällen betreuen die Kliniken dabei weniger als 40 VLBW-Frühgeborene pro Jahr. Einschlusskriterium ist neben dem geringen GG ein  $GA \leq 36+6$  SSW. Ausschlusskriterium ist die Verlegung aus einer anderen Kinderklinik in ein Studienzentrum. Erfasst werden die klinischen Daten während der ersten fünf Lebensjahre. Die Studienzentrale ist die Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität Lübeck. In der vorliegenden Arbeit wird Datenmaterial von Kindern einbezogen, die im Zeitraum von Januar 2009 bis Dezember 2014 in die Studie eingeschlossen wurden und ein GA zwischen 22+0 SSW und 31+6 SSW aufwiesen.

Die Studie hat zum Ziel, Umweltfaktoren sowie genetische und klinische Faktoren zu identifizieren, die sich auf die langfristige körperliche und geistige Entwicklung der Frühgeborenen auswirken. Eine solche Identifikation kann einerseits ein prophylaktisches Handeln sowie andererseits eine gezielte Therapie ermöglichen.

Um ein Kind in die Studie einzuschließen, muss eine ausführliche Aufklärung der Eltern stattfinden und auf einem unterschriebenen Einverständnisbogen (siehe Anhang A.1) dokumentiert werden. Die klinischen Daten werden danach zu drei Zeitpunkten erhoben: Während des postnatalen Aufenthaltes in der Klinik sowie im Alter von zwei und fünf Jahren.

Liegt der unterschriebene Einverständnisbogen vor, werden auf dem Dokumentationsbogen 1 (siehe Anhang A.2) Angaben zum Kind, zur Mutter sowie zur Geburt erfasst. Diese Datenerfassung erfolgt durch das behandelnde Studienzentrum. Um eine valide Datenerhebung zu gewährleisten, erfolgt eine Schulung durch die Studienzentrale nach Einschluss der Klinik in das GNN. Außerdem werden je zwei Mundschleimhautabstriche von Mutter und Kind gewonnen und zusammen mit dem Dokumentationsbogen 1 nach Lübeck geschickt. Des Weiteren wird ein kurzes Stück Nabelschnur entnommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Nabelschnüre werden in regelmäßigen Abständen gesammelt nach

Lübeck transportiert. Neben der Erfassung der klinischen Daten ist es somit möglich, aus den Schleimhautabstrichen und Nabelschnurproben DNA zu isolieren und folglich genetische Untersuchungen vorzunehmen.

Auf den Dokumentationsbögen 2 und 3 (siehe Anhang A.3 und A.4) wird bei Entlassung, Versterben oder Verlegung des Kindes der Verlauf des stationären Aufenthaltes erfasst. Dokumentationsbogen 4 (siehe Anhang A.5) wird im Falle einer Verlegung vom in der Verlegungsklinik zuständigen Neonatologen bei Entlassung oder Versterben des Kindes ausgefüllt.

Um die langfristige körperliche und geistige Entwicklung erfassen zu können, erfolgt zunächst eine ambulante Nachuntersuchung im Alter von zwei Jahren im jeweiligen Studienzentrum.

Die erneute Nachuntersuchung im Alter von fünf Jahren wird durch Personal der Studienzentrale Lübeck durchgeführt. Dabei werden einerseits klinische Daten erhoben und andererseits verschiedene Tests – wie beispielsweise ein Entwicklungstest oder eine Untersuchung der grob- und feinmotorischen Fähigkeiten – durchgeführt. Alle angewandten Tests und Erhebungsbögen sind standardisiert und wurden an großen Kohorten validiert. Sie werden zudem in internationalen Studien als Standard eingesetzt.

Die Eltern erhalten in regelmäßigen Abständen Fragebögen zur Erfassung des sozialen Umfeldes, der Ernährung, der Bildung und des Gesundheitsverhaltens. Diese Fragebögen wurden bereits im Rahmen der KIGGS-Studie eingesetzt, bei der das Robert-Koch-Institut über 17 000 Kinder im Alter von 0 – 17 Jahren untersuchte. Die 2007 publizierte Studie bietet somit einen großen Pool an Vergleichsdaten.

Zur Gewährleistung des Datenschutzes wurden zwei getrennte Datenbanken für die personenbezogenen und klinischen Daten angelegt. Die klinischen Daten werden pseudonymisiert und sind mit den personenbezogenen Daten nur über eine Identifikationsnummer verknüpft. Die Eingabe der Daten erfolgt doppelt kontrolliert. Die in den Studienzentren erhobenen Daten werden halbjährlich überprüft. Dabei erfolgt eine Kontrolle auf Vollständigkeit der klinischen Angaben. Zusätzlich werden Frühgeborene erfasst, die zwar die Einschlusskriterien erfüllen, aber nicht eingeschlossen wurden. Von diesen Frühgeborenen werden ausgewählte Parameter pseudonymisiert erhoben.

Die Studie wurde von den Ethikkommissionen der Studienzentrale Lübeck sowie aller teilnehmenden Studienzentren befürwortet (Aktenzeichen der Ethikkommission Lübeck 08-022, Datum: 27.06.2008).

## 2.2 Definition der Endpunkte

Die Endpunkte sind durch die Studienleitung wie folgt definiert bzw. auf Grundlage der erhobenen Daten berechnet:

Small for gestational age (SGA):	Frühgeborenes mit einem Geburtsgewicht unter der zehnten Perzentile der für sein Gestationsalter entsprechenden Normalverteilung (Voigt et al., 2012).	
Intraventrikuläre Hämorrhagie (IVH):	Einteilung in vier Grade: Grad 1: Subependymale Blutung Grad 2: Ventrikel Einbruchsblutung, < 50 % des Ventrikelvolumens Grad 3: Ventrikel Einbruchsblutung, > 50 % des Ventrikelvolumens Grad 4: Periventrikuläre Hämorrhagie, unabhängig vom Ausmaß der begleitenden intraventrikulären Hämorrhagie	
Periventrikuläre Leukomalazie (PVL):	Parenchymale, periventrikuläre zystische Läsion als Folge einer ischämischen Hirngewebsnekrose, z.B. im Rahmen einer perinatalen Asphyxie.	
Antenatale Lungenreife:	Antenatale i.m. Gabe von 2 x 12 mg Betamethason im Abstand von 24 Stunden (alternativ 4 x 6 mg Dexamethason) an die Mutter.	
Tracheale Beatmung:	Jegliche tracheale Beatmung einschließlich intraoperativer Beatmung.	
Sepsis	Alle Definitionen werden in Anlehnung an das NEO-KISS Surveillance-Protokoll verwendet.  Sepsis (klinisch) Klinische Zeichen einer Sepsis (beispielsweise reduzierte Mikrozirkulation, Atemstörung, metabolische Störungen).  Sepsis mit ErregerNachweis Klinische Zeichen einer Sepsis und zusätzlich Nachweis des Erregers in der Blutkultur.  Early-Onset-Sepsis Auftreten einer Sepsis innerhalb der ersten 72 Lebensstunden.	

## 2.3 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung erfolgte bevorzugt aus den Nabelschnüren, da die DNA hier höher konzentriert vorliegt als in den Mundschleimhautabstrichen. Die Abstriche dienten damit als Reserve, falls keine Nabelschnüre vorlagen. Allerdings ist die Isolation aus den Abstrichen weniger aufwendig, weshalb von 2012 – 2013 ausschließlich Abstriche genutzt wurden.

Die Isolierung der DNA aus den Abstrichen wurde mittels QIAamp® DNA Mini Kit der Firma QIAGEN durchgeführt und beruht auf dem Prinzip der Adsorptions-Chromatographie. Hierbei wurde zunächst ein Puffer und eine Protease zu dem Abstrich-Tupfer gegeben, um die Zellen zu lysieren sowie die Proteine zu spalten. Anschließend wurde Ethanol als Lösungsmittel hinzugefügt. Das Lysat wurde dann auf eine Säule gegeben und zentrifugiert. Dabei fand die Adsorption der DNA an einer Membran aus Silica-Gel statt, während das Filtrat verworfen werden konnte. Dieser Arbeitsschritt wurde mehrfach wiederholt. Es folgten zwei Waschschrifte mittels Waschpuffern. Im Anschluss wurde die DNA in Lösung gebracht. Die DNA-Isolierung erfolgte nach leicht abgewandeltem Protokoll des Herstellers (siehe Anhang A.6).

Für die DNA-Extraktion aus Nabelschnüren wurde das Gentra® Puregene® Tissue Kit der Firma QIAGEN verwendet. Zunächst wurde Cell Lysis Solution zur Nabelschnur hinzugefügt, um die Zellen zu lysieren. Anschließend wurden mittels RNase und Proteinase RNA und Proteine in der Lösung abgebaut. Durch Zugabe von Protein Precipitation Solution wurden noch in Lösung befindliche Proteine ausgefällt und lagen anschließend als Pellet vor, das verworfen wurde. Dieser Arbeitsschritt wurde danach erneut durchgeführt. Im Anschluss wurde die übrig gebliebenen DNA in Isopropanol gegeben und fällt aus. Das entstandene DNA-Pellet wurde in zwei Waschschriften mit Ethanol gereinigt und schließlich mittels DNA Hydration Solution in Lösung gebracht. Die Extraktion der DNA aus den Nabelschnüren wurde ebenfalls nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers durchgeführt (siehe Anhang A.7).

Das aus den Nabelschnüren gewonnene DNA-Isolat wurde anschließend einer Konzentrationsmessung unterzogen. Das Isolat wurde nachfolgend soweit verdünnt, bis die Konzentration im Bereich von 50 – 70 ng/µl lag. Nur wenn die Konzentrationsmessung Werte unter 35 ng/µl ergab, musste die Messung wiederholt werden. Die Konzentration der aus den Abstrichen gewonnenen DNA musste nicht bestimmt werden, da hierbei nicht mit zu hohen DNA-Konzentrationen zu rechnen ist.

Die so gewonnenen DNA-Isolate wurden für die allelische Diskriminierung verwendet.

## 2.4 Allelische Diskriminierung

Die allelische Diskriminierung basiert auf einer qualitativen PCR. Hierbei werden fluoreszierende Gensonden genutzt, um allelespezifische PCR-Produkte zu detektieren.

Die isolierte DNA wurde zunächst auf 96-Well-Platten und für die PCR mittels Achtkanalpipette auf 384-Well-Platten überführt. Jedes Well enthielt nun 1 µl DNA-Isolat aus Nabelschnüren bzw. 2 µl DNA-Isolat aus Mundschleimhautabstrichen. Das sollte gewährleisten, dass den nachfolgenden Messungen vergleichbare DNA-Konzentrationen zu Grunde lagen, da die DNA in den Mundschleimhautabstrichen und dem daraus resultierenden Isolat geringer konzentriert ist. Zunächst erfolgte die Zugabe von TaqMan® Genotyping Master Mix (Applied Biosystems), Ampuwa® (Fresenius Kabi) und SNP Genotyping Assay Mix (Applied Biosystems) mittels Multipette (Tabelle 1). Anschließend wurde die Platte mittels Klebefolie luftdicht verschlossen, auf dem Rüttler vermischt und zentrifugiert.

*Tabelle 1: Protokoll PCR-Reagenzien*

Reagenz	Hersteller / Firma	Menge pro Probe [µl]
Proben DNA		
Nabelschnur		1
Abstrich		2
TaqMan® Genotyping Master Mix	Applied Biosystems	2,525
Ampuwa®	Fresenius Kabi	2,425
SNP Genotyping Assay Mix	Applied Biosystems	0,05

Die PCR wurde im Taq Man® HT 7900 (Applied Biosystems) durchgeführt (Tabelle 2). Bei dieser allel spezifischen PCR werden Gensonden verwendet, an deren 5'-Ende ein Reporter gekoppelt ist. Dabei handelt es sich um einen fluoreszierenden Farbstoff. Eingesetzt werden die beiden Farbstoffe VIC® und FAM™. Am 3'-Ende der Gensonde befindet sich ein Quencher, der das Fluoreszieren des Reporters durch Förster-Resonanzenergietransfer unterdrückt, sofern er sich in räumlicher Nähe befindet. Sind also Reporter und Quencher beide an die intakte Gensonde gebunden, sendet der Reporter kein Fluoreszenzsignal aus. Bei der allelischen Diskriminierung werden zwei Gensonden verwendet, die sich lediglich in einer Base unterscheiden. Sie stellen damit zwei Varianten des SNP dar, wobei eine Gensonde den Wildtyp und die andere die Mutation detektiert. Die zu den Gensonden passende Sequenz befindet sich innerhalb des Bereiches der DNA, der bei der PCR amplifiziert wird. Während der PCR bindet eine der beiden Gensonden an den exakt komplementären Bereich der Proben-DNA. Im Rahmen der Elongation des DNA-Doppelstranges trifft nun die Taq-DNA-Polymerase auf die gebundene Gensonde und trennt diese von ihrer komplementären DNA-Sequenz. Dabei wird die Gensonde aufgespalten und die räumliche Nähe von Reporter und Quencher geht verloren. Der Farbstoff sendet nun ein spezifisches Fluoreszenzsignal bei Anregung durch Licht entsprechender Wellenlänge aus. Die emittierte Wellenlänge zeigt an, welches Allel vorhanden ist. Homozygote Merkmalsträger senden Licht einer Wellenlänge aus, heterozygote Merkmalsträger Licht zweier Wellenlängen (Abbildung 2). Die PCR folgte dem Protokoll des Herstellers.

Tabelle 2: Protokoll PCR-Ablauf

Gerät: TaqMan 7900	Temperatur [C°]	Zeit [min]
Aktivierung der Taq DNA-Polymerase	95	10
Zyklen		
Denaturierung	92	0:15
Annealing/ Extension	60	1

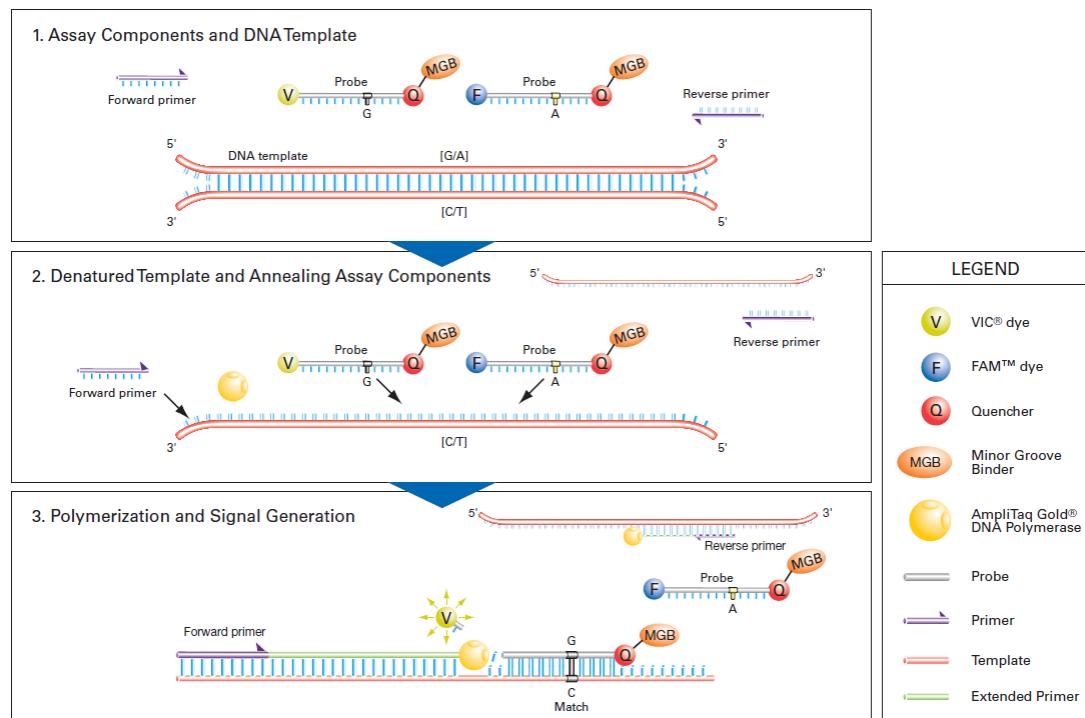


Abbildung 2: Schematische Darstellung der allelischen Diskriminierung (nach Thermo Fisher Scientific, 2010)

Die Auswertung erfolgte mittels Sequence Detection System-Software (Version 2.4) und fand automatisiert statt (Abbildung 3), allerdings gab es eine manuelle Überprüfung der Negativkontrollen. Wurde hier eine starke Abweichung vom zu erwarteten Leerwert gemessen, wurde der Durchlauf wiederholt. So konnte das Risiko einer Kontamination minimiert werden. Zudem wurde das Risiko dieser zufälligen Fehler dadurch verringert, dass einzelne Proben doppelt gemessen wurden.

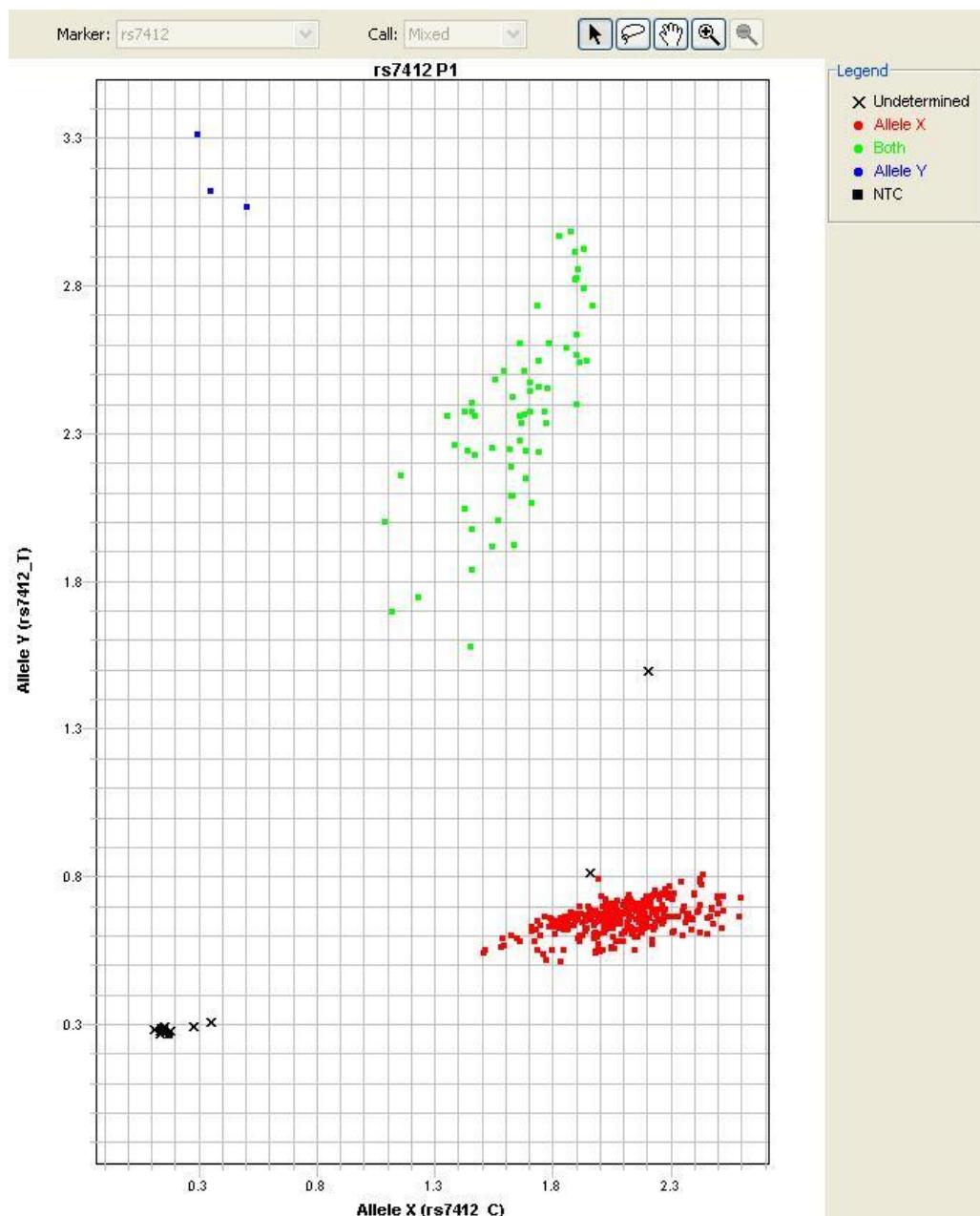


Abbildung 3: Cluster Plot zur allelischen Diskriminierung

Darstellung der Auswertung einer PCR: Die rote und blaue Wolke entsprechen jeweils den Homozygoten, die grüne Wolke entspricht den Heterozygoten. Die Kreuze stellen die Proben dar, die nicht bestimmt werden konnten, die schwarzen Quadrate stellen Leerwerte dar.

## 2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels SPSS-Software (Version 22). Zur Beschreibung der kategorialen Variablen wie Geschlecht oder Herkunft der Mutter wurden Häufigkeiten verwendet. Die metrisch skalierten Variablen wie GA oder GG wurden hingegen mit Hilfe von Mittelwert und Standardabweichung beschrieben. Zur Prüfung auf signifikante Unterschiede wurde für metrisch skalierte Variablen der T-Test angewandt. Die kategorialen Variablen wurden mittels exaktem Test nach Fischer und Pearson-Chi-Quadrat-Test untersucht. Dabei wurden jeweils separate p-Werte für Apo E2 vs. Apo E3 sowie Apo E3 vs. Apo E4 berechnet.

Zur Beurteilung eines dosisabhängigen Effektes von der Anzahl an Apo E-Polymorphismen auf das Auftreten einer schweren IVH wurde eine logistische Regression durchgeführt, da Studien bei Erwachsenen ein dosisabhängiges genetisches Modell für den Einfluss von Apo E auf IZBs angeben (Biffi et al., 2010; Biffi et al., 2011).

Um den quantitativen Einfluss verschiedener klinischer Risikofaktoren auf das Auftreten einer schweren IVH festzustellen, wurde ebenfalls eine logistische Regression angewendet. Dabei wurde sich an einer logistischen Regression orientiert, die von Ment. et al beschrieben wurde (Ment et al., 2015). Diese enthielt die Risikofaktoren GA, antenatale Steroidgabe, Apgar < 3 mit 5 min, Intubation und Pneumothorax. Bei der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten logistischen Regression wurden zudem SGA, Mehrling, Geschlecht und mütterliche Herkunft ergänzt, da diese bekannte Risikofaktoren darstellen (Handley et al., 2018) bzw. mit Apo E assoziiert sind (Utermann, 1987).

Alle in dieser Arbeit genannten Signifikanztests sind zweiseitig. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt mit Anpassungen nach Bonferroni-Holm, da zwei genetische Varianten getestet wurden.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Studienpopulation

Die Auswahl der Frühgeborenen verdeutlicht Abbildung 4. Von Januar 2009 bis Dezember 2014 wurden insgesamt 10 259 Frühgeborene in das GNN eingeschlossen. Aus diesen Frühgeborenen wurden solche mit einem GA zwischen 22+0 SSW und 31+6 SSW selektiert. Zudem mussten einerseits zwingend Angaben zur IVH vorhanden sein, was eine Schädel-Sonographie voraussetzte. Andererseits mussten DNA-Proben vorliegen. Das führte zu einer Auswahl von 8 694 Frühgeborenen, von denen 7 952 erfolgreich genotypisiert wurden.

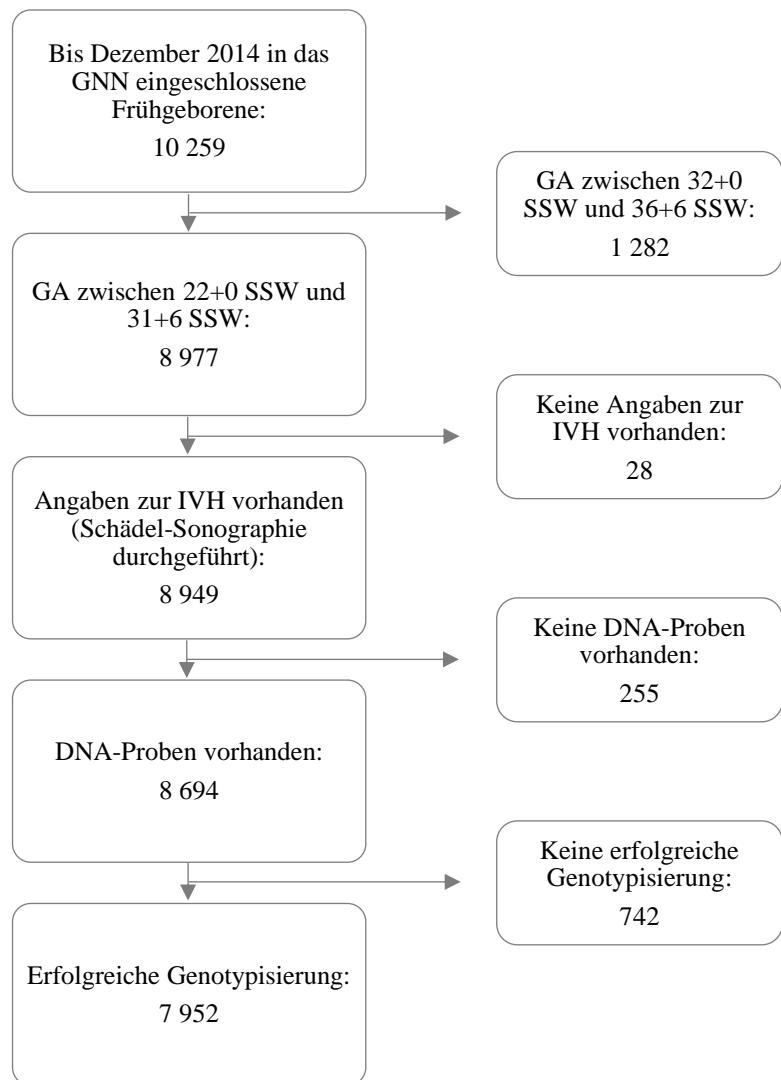


Abbildung 4: Einschluss der Frühgeborenen aus dem GNN in die vorliegende Arbeit

## 3.2 Ergebnisse der allelischen Diskriminierung

Die SNPs im Apo E-Gen betreffen die Positionen 3 937 und 4 075 im Apo E Gen. Zur besseren Einteilung aller vorkommenden SNPs werden ihnen eindeutige Nummern zugewiesen, wobei der SNP an Position 3 937 als rs429358 und der SNP an Position 4 075 als rs7412 bezeichnet wird.

Die Genotypisierung war erfolgreich in 96,0 % (rs7412) bzw. 93,6 % (rs429358). Bei 7 952 Frühgeborenen konnten beide SNPs erfolgreich bestimmt werden. Dies entspricht 91,9 %.

Die Ergebnisse der allelischen Diskriminierung dieser 7 952 Frühgeborenen sind in Tabelle 3 dargestellt.

*Tabelle 3: Ergebnisse der allelischen Diskriminierung*

	SNP-Ausprägung	Anzahl (n = 7952)	Verteilung [%]
rs7412	C/C	6835	86,0
	C/T	1070	13,5
rs429358	T/T	47	0,6
	T/T	6040	76,0
	C/T	1790	22,5
	C/C	122	1,5

### 3.3 Verteilung der Apo E Haplotypen, Allele und Genotypen

Aus der Genotypisierung ergeben sich die in Tabelle 4 aufgezeigten sechs Haplotypen und ihre Häufigkeiten.

*Tabelle 4: Verteilung der Apo E Haplotypen*

	E2/E2	E2/E3	E3/E3	E3/E4	E2/E4	E4/E4
rs7412	T/T	C/T	C/C	C/C	C/T	C/C
rs429358	T/T	T/T	T/T	C/T	C/T	C/C
Anzahl (n = 7952)	47	918	5075	1638	152	122
Verteilung [%]	0,6	11,5	63,8	20,6	1,9	1,5

Anhand der sechs Haplotypen werden – wie in Tabelle 5 dargestellt – die drei Genotypen Apo E2, Apo E3 und Apo E4 abgeleitet, um im nachfolgenden Teil der Arbeit drei Vergleichsgruppen zu haben: Der Genotyp Apo E3 wird dabei gebildet aus dem Haplotype E3/E3, Apo E2 wird aus den Haplotypen E2/E2 und E2/E3 gebildet und Apo E4 leitet sich aus den Haplotypen E4/E4, E2/E4 und E3/E4 ab (Zannis et al., 1981; Koch et al., 2002). Für die drei Genotypen ergeben sich Häufigkeiten von 12,1 % (n = 965) für Apo E2, 63,8 % (n = 5075) für Apo E3 sowie 24,0 % (n = 1912) für Apo E4.

*Tabelle 5: Bildung der Apo E Genotypen aus den Apo E Haplotypen*

Apo E Haplotype	E2/E2	E2/E3	E3/E3	E3/E4	E2/E4	E4/E4
Apo E Genotyp	E2		E3		E4	
Anzahl (n = 7952)	965		5075		1912	
Verteilung [%]	12,1		63,8		24,0	

Ausgehend von den Haplotypen lässt sich die Verteilung der Apo E Allele ableiten. Diese zeigen Häufigkeiten von 7,3 % (n = 582) für Apo E2, 79,9 % (n = 6353) für Apo E3 sowie 12,8 % (n = 1017) für Apo E4.

Tabelle 6 vergleicht die Häufigkeiten der Apo E Allele aufgetrennt nach der Herkunft der Mütter.

Dabei zeigt sich, dass Apo E3 mit 78,8 % seltener bei Frühgeborenen mit Müttern deutscher Herkunft auftritt (nur Kinder mit Müttern afrikanischer Herkunft sind noch seltener Träger eines Apo E3 Allels), während sich sowohl für Apo E2 mit 7,7 % als auch für Apo E4 mit 13,5 % eine Häufung zeigt, die ebenfalls nur dann ausgeprägter ist, wenn Mütter afrikanischer Herkunft sind.

Bei Betrachtung der weiteren Subgruppen fällt auf, dass Apo E2 seltener bei Kindern mit asiatischer Herkunft der Mütter auftritt. Apo E3 zeigt sich hingegen deutlich häufiger bei Frühgeborenen mit mütterlicher Herkunft aus dem Nahen Osten einschließlich der Türkei, während sich in dieser Subgruppe zudem ein selteneres Auftreten des Apo E4 Allels feststellen lässt. Eine mütterliche Herkunft, die keiner der genannten Subgruppen zuzuordnen ist, fällt unter die Kategorie Sonstige. Auf diese wird hier nicht genauer eingegangen.

*Tabelle 6: Verteilung der Apo E Allele bezogen auf die Herkunft der Mütter*

	Deutschland (n = 5804)	Übriges Europa inklusive Russland (n = 852)	Naher Osten inklusive Türkei (n = 604)	Asien (n = 137)	Afrika (n = 363)	Sonstige (n = 192)
Apo E2 [%]	7,7	6,3	6,1	3,7	8,1	5,7
Apo E3 [%]	78,8	81,6	86,1	82,8	78,0	86,5
Apo E4 [%]	13,5	12,1	7,8	13,5	13,9	7,8

### 3.4 Klinische Daten in Bezug auf den Apo E Genotyp

Die Tabelle 7 zeigt klinische Daten der Frühgeborenen.

*Tabelle 7: Klinische Daten in Abhängigkeit vom Apo E Genotyp*

	Apo E2 (n = 965)	Apo E3 (n = 5075)	Apo E4 (n = 1912)	p <sup>#</sup> E3 vs. E2	p <sup>#</sup> E3 vs. E4
Gestationsalter* [Wochen]	28,1/ 2,3	28,1/ 2,3	28,1/ 2,3	0,501	0,876
Geburtsgewicht* [g]	1025/ 295	1022/ 300	1024/ 297	0,754	0,814
Männliches Geschlecht [%]	51,2	52,8	52,2	0,363	0,687
Mehrling [%]	33,6	34,0	34,2	0,776	0,903
SGA [%]	9,5	12,1	11,2	0,024	0,307
Mutter deutscher Herkunft [%]	76,0	70,9	77,0	0,001	< 0,001

\* Mittelwert/ Standardabweichung, # T-Test für Gestationsalter und Geburtsgewicht, Pearson-Chi-Quadrat-Test für alle anderen Variablen

Auffällig ist, dass Kinder mit dem Apo E2 Genotyp seltener als SGA geboren werden. Während 12,1 % der Frühgeborenen mit Apo E3 eine Geburt als SGA aufweisen, sind es unter Apo E2 nur 9,5 % ( $p = 0,024$ ). Für Apo E4 zeigt sich hingegen keine Differenz im Vergleich zu Apo E3 (11,2 %,  $p = 0,307$ ).

Es zeigt sich außerdem ein auffälliger Unterschied in Bezug auf die Herkunft der Mütter. 76,0 % der Frühgeborenen mit Apo E2 Genotyp und 77,0 % der Frühgeborenen mit Apo E4 Genotyp haben eine Mutter deutscher Herkunft. Hingegen sind es unter Apo E3 70,9 % ( $p = 0,001$  für E2 vs. E3 sowie  $p < 0,001$  für E3 vs. E4).

Ansonsten unterscheiden sich die Gruppen nicht signifikant.

## 3.5 IVH

### 3.5.1 Einfluss des Apo E Genotyps auf die IVH und PVL

Hirnblutungen finden sich bei 1 456 Frühgeborenen im Gesamtkollektiv (18,3 %). Sie sind dabei sowohl bei Apo E2 mit 20,1 % ( $p = 0,049$ ) als auch bei Apo E4 mit 19,8 % ( $p = 0,023$ ) signifikant häufiger als bei Frühgeborenen mit Apo E3, bei denen 17,4 % eine IVH entwickeln. Eine schwere IVH (Grad 3/4) zeigt sich mit 7,8 % unter Trägern des Apo E2 Genotyps sowie mit 7,6 % unter Trägern des Apo E4 Genotyps, während sich bei 5,5 % der Frühgeborenen mit Apo E3 eine schwere IVH ausbildet. Auch diese statistische Häufung ist signifikant, der relative Unterschied von Apo E2 bzw. Apo E4 zu Apo E3 ist dabei noch deutlicher. Die Odds Ratio (OR) Apo E2 verglichen mit Apo E3 beträgt 1,4 (95 %-Konfidenzintervall (KI): 1,1 – 1,9,  $p = 0,009$ ), die OR Apo E4 verglichen mit Apo E3 beträgt ebenfalls 1,4 (95 %-KI: 1,1 – 1,7,  $p = 0,001$ ).

Des Weiteren lässt sich ein gehäuftes Auftreten einer PVL bei Frühgeborenen mit Apo E2 Genotyp im Vergleich zu Apo E3 beobachten (5,5 % vs. 2,9 %,  $p < 0,001$ ). Bei Trägern des Apo E4 Genotyps zeigt sich eine PVL in 3,8 %, es lässt sich jedoch kein Unterschied feststellen ( $p = 0,065$ ).

Vergleicht man die drei Genotypen auf das Auftreten einer IVH Grad 2 – 4 oder PVL, so findet sich unter Apo E2 bei 16,0 % der Frühgeborenen eine entsprechende Erkrankung des kindlichen Gehirns im Vergleich zu 11,3 % unter Apo E3 ( $p < 0,001$ ). Und auch bei Apo E4 zeigt sich mit 13,7 % eine signifikante Häufung ( $p = 0,009$ , Tabelle 8).

Tabelle 8: IVH und PVL in Abhängigkeit vom Apo E Genotyp

	Apo E2 (n = 965)	Apo E3 (n = 5075)	Apo E4 (n = 1912)	p <sup>#</sup> E3 vs. E2	p <sup>#</sup> E3 vs. E4
IVH [%]	20,1	17,4	19,8	0,049	0,023
IVH Grad 3/4 [%]	7,8	5,5	7,6	0,009	0,001
PVL [%]	5,5	2,9	3,8	< 0,001	0,065
IVH Grad 2 – 4 oder PVL [%]	16,0	11,3	13,7	< 0,001	0,009

# exakter Test nach Fisher

In Abbildung 5 wurde untersucht, ob ein dosisabhängiger Effekt zwischen der Anzahl an Apo E-Polymorphismen und dem Auftreten einer schweren IVH besteht. Hierbei wurde nicht zwischen Apo E2 und Apo E4 unterschieden, sondern nur festgestellt, wie viele Apo E2- und Apo E4-Allele vorhanden sind. Die Gruppe ohne Apo E-Polymorphismen wird dabei nur vom Haplotyp E3/E3 gebildet, zur Gruppe mit einem Polymorphismus zählen die Haplotypen E2/E3 und E3/E4, während die Gruppe mit zwei Polymorphismen die Haplotypen E2/E2, E2/E4 und E4/E4 einschließt. Die dargestellten Daten wurden mittels logistischer Regression gewonnen.

Während in der Gruppe ohne Polymorphismus nur 5,5 % schwere IVHs vorkommen, sind es in der Gruppe mit einem Polymorphismus 7,6 %. Dieser Unterschied ist signifikant ( $p = 0,001$ ), die OR beträgt 1,4 (KI: 1,2 – 1,7). Frühgeborene mit 2 Polymorphismen tragen das höchste Risiko für eine schwere IVH, hier beträgt die Häufigkeit 8,7 %. Diese Differenz ist ebenfalls statistisch signifikant ( $p = 0,018$ ), die OR beträgt 1,6 (KI: 1,1 – 2,5).

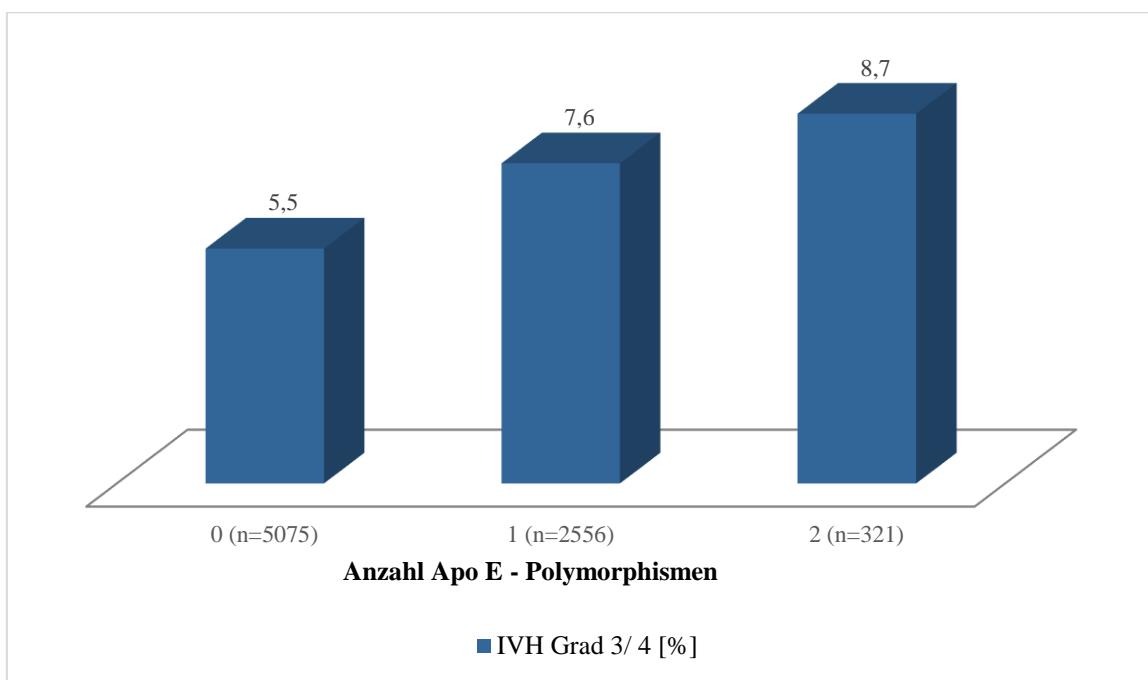


Abbildung 5: IVH Grad 3/4 in Abhängigkeit von der Anzahl der Apo E-Polymorphismen

Es wurde bereits beschrieben, dass Frühgeborene mit einem Apo E2 Genotyp signifikant häufiger an einer PVL erkranken (Tabelle 8). Um zu untersuchen, ob diese Häufung tatsächlich vorliegt oder lediglich mit dem gehäuften Auftreten der IVH assoziiert ist, wurde sich die Subgruppe der Kinder ohne IVH angeschaut. In dieser Subgruppe weisen Frühgeborene mit dem Apo E3 Genotyp eine PVL-Rate von 1,2 % (49/ 4187) auf, während bei Frühgeborenen mit dem Apo E2 Genotyp in 2,3 % (18/ 771) eine PVL auftritt. Der

Unterschied zwischen den beiden Genotypen bleibt dabei statistisch signifikant ( $p = 0,016$ , exakter Test nach Fisher).

Die nachfolgende Abbildung 6 zeigt die Verteilung der IVH-Grade. In der gesamten Kohorte finden sich 1 456 Hirnblutungen. Dabei tritt IVH Grad 1 mit 40,4 % am häufigsten auf, während IVH Grad 2 in 25,1 %, IVH Grad 3 in 16,4 % und IVH Grad 4 in 18,1 % aller Hirnblutungen in der Kohorte vorliegen.

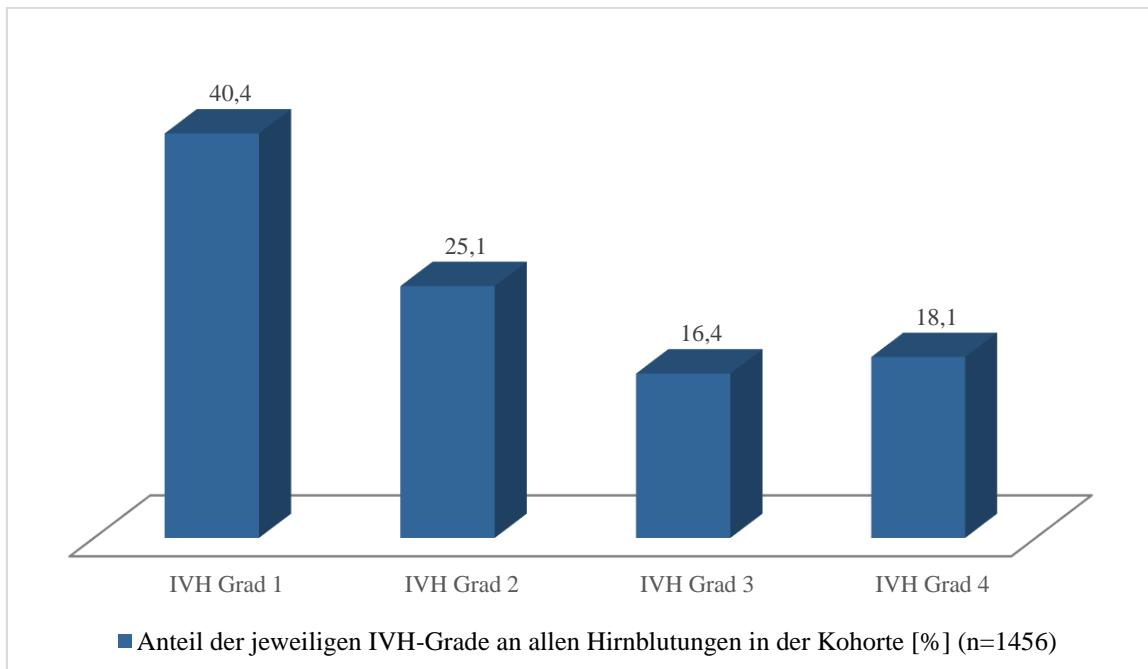


Abbildung 6: Verteilung der IVH-Grade in Bezug auf alle Hirnblutungen in der Kohorte

In Abbildung 7 ist dargestellt, wie sich die Verteilung der IVH-Grade unter Betrachtung der drei Genotypen verhält. Bei Apo E2 treten 38,7 % schwere Hirnblutungen auf, während sich bei Apo E3 31,8 % schwere Hirnblutungen zeigen. Dabei handelt es sich jedoch nicht um einen statistisch signifikanten Unterschied ( $p = 0,076$ , exakter Test nach Fisher).

Bei Apo E4 hingegen lassen sich 38,6 % schwere Hirnblutungen feststellen und der Unterschied zu Apo E3 ist signifikant ( $p = 0,020$ , exakter Test nach Fisher).

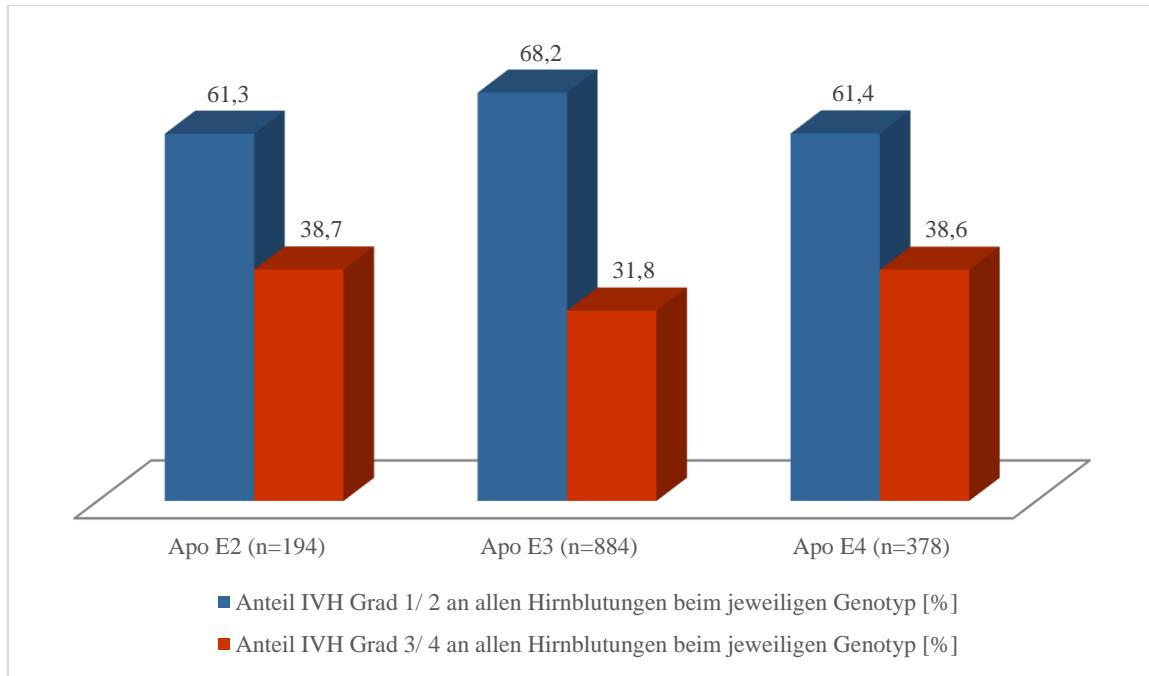


Abbildung 7: Verteilung der IVH-Grade in Abhängigkeit vom Apo E Genotyp

### 3.5.2 Risikofaktoren für eine IVH

Um den Einfluss verschiedener klinischer Risikofaktoren auf das Auftreten einer IVH zu beurteilen, wurde eine logistische Regression durchgeführt (Abbildung 8, siehe auch Tabelle 10 im Anhang A.8).

Frühgeborene mit einer schweren IVH sind durchschnittlich zwei Wochen früher geboren als Frühgeborene ohne schwere IVH. Ein niedriges GA ist ein statistisch signifikanter klinischer Risikofaktor ( $p < 0,001$ ) für eine schwere IVH mit einer OR von 0,75 (KI: 0,71 – 0,78).

Bei weiterer Betrachtung stellen sich zudem ein männliches Geschlecht (OR: 1,27, KI: 1,04 – 1,55,  $p = 0,016$ ), ein Mehrlingsstatus (OR: 1,51, KI: 1,24 – 1,85,  $p < 0,001$ ) sowie ein Pneumothorax (OR: 2,06, KI: 1,55 – 2,73,  $p < 0,001$ ) als signifikante Risikofaktoren für schwere Hirnblutungen heraus.

Den stärksten Einfluss auf die Entwicklung einer schweren IVH hat in unserer Kohorte jedoch die tracheale Beatmung mit einer OR von 7,01 (KI: 4,74 – 10,38,  $p < 0,001$ ), während ein Apgar < 3 nach 5 Minuten den zweitstärksten Einflussfaktor darstellt und dabei eine OR von 2,67 aufweist (KI: 1,49 – 4,81,  $p = 0,001$ ).

Hingegen werden Frühgeborene mit schwerer IVH seltener als SGA geboren, SGA stellt somit einen protektiven Faktor für eine schwere IVH dar (OR: 0,64, KI: 0,47 – 0,88,  $p = 0,006$ ).

Des Weiteren erweist sich eine antenatale Steroidgabe als protektiv gegenüber schweren Hirnblutungen. Folglich zeigen Frühgeborene, die keine antenatale Steroidgabe erhalten, ein erhöhtes Risiko für schwere Hirnblutungen mit einer OR von 2,23 (KI: 1,73 – 2,87,  $p < 0,001$ ).

Eine Mutter deutscher Herkunft ist dagegen kein eigenständiger Risikofaktor (OR: 1,15, KI: 0,92 – 1,43,  $p = 0,216$ ).

Ferner zeigt sich, dass auch Apo E2 und Apo E4 unter Berücksichtigung der anderen Einflussfaktoren als eigenständige Risikofaktoren bestehen bleiben. Die OR für Apo E2 beträgt 1,33 (KI: 1,00 – 1,76,  $p = 0,049$ ), während die OR für Apo E4 bei 1,39 (KI: 1,12 – 1,74,  $p = 0,003$ ) liegt. Dabei kommt der Apo E2 Genotyp mit einer Häufigkeit von 14,9 % unter Frühgeborenen mit schwerer IVH vor. Er findet sich jedoch nur in 11,4 % unter Frühgeborenen, die keine schwere IVH entwickelten. Der Apo E4 Genotyp zeigt dabei in ähnlicher Weise Häufigkeiten von 29,1 % im Rahmen einer schweren IVH und 23,7 % bei Frühgeborenen ohne schwere IVH.

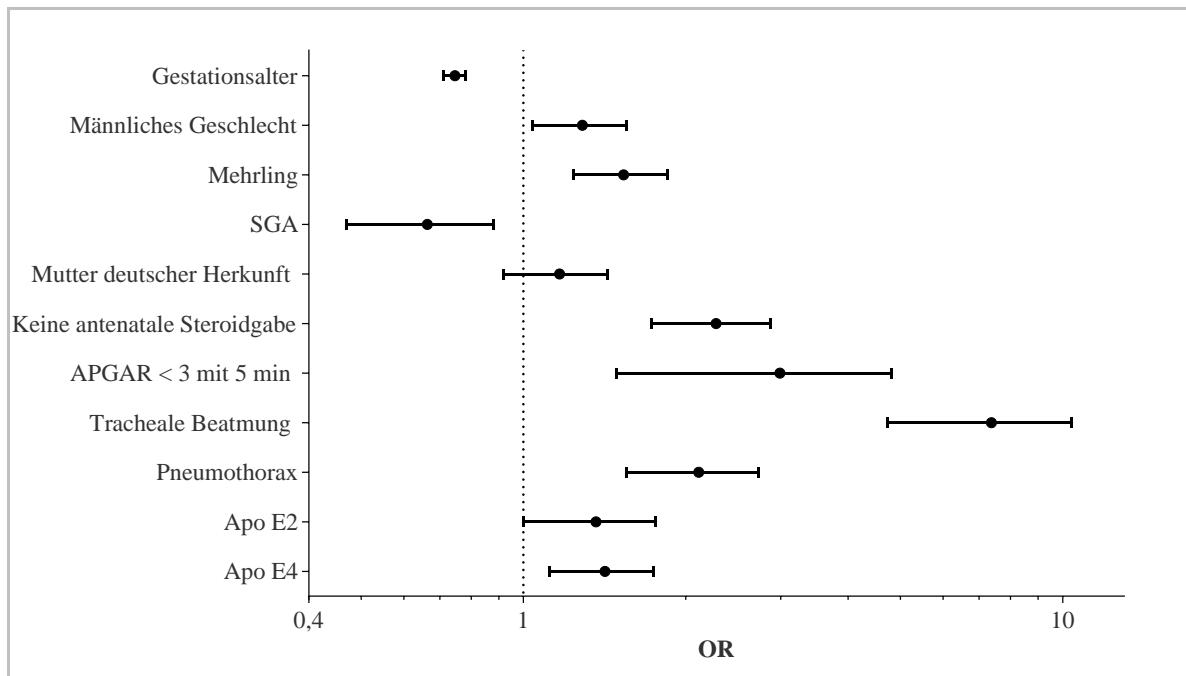


Abbildung 8: ORs der klinischen Risikofaktoren für eine schwere IVH

Die Punkte stellen die ORs dar, die Balken jeweils das 95 %-KI ( $n = 7952$ ).

### 3.5.3 Einfluss von antenataler Steroidgabe und Apo E Genotyp auf die IVH

Im vorangehenden Abschnitt wurde bereits dargestellt, dass die antenatale Steroidgabe zur Induktion der Lungenreife sich in unserem Kollektiv protektiv gegenüber Hirnblutungen zeigte. Dieser Aspekt soll nun genauer beleuchtet werden. In Abbildung 9 wird deshalb untersucht, ob die unterschiedlichen Apo E Genotypen einen Einfluss auf den Effekt der vorgeburtlichen Steroidgabe haben.

Bei Frühgeborenen mit Apo E4 Genotyp, die keine antenatale Steroidgabe erhielten, treten 17,5 % schwere Hirnblutungen auf. Hingegen zeigen Kinder ohne antenatale Steroidgabe mit Apo E3 Genotyp in 12,7 % schwere Hirnblutungen. Dabei findet sich allerdings kein statistisch signifikanter Unterschied ( $p = 0,127$ , exakter Test nach Fisher). Bei Apo E4 lässt sich die größte absolute Risikoreduktion (ARR) erkennen. Durch antenatale Lungenreifeinduktion verringert sich der Anteil schwerer Hirnblutungen von 17,5 % auf 6,6 %. Die ARR beträgt somit 10,9 %, während Apo E3 eine ARR von lediglich 7,9 % aufweist.

Bei Apo E2 beträgt der Anteil schwerer IVHs 14,0 %. Allerdings zeigt sich im Vergleich zu Apo E3 ebenfalls keine signifikante Differenz und die ARR fällt zudem nicht größer aus (6,9 %).

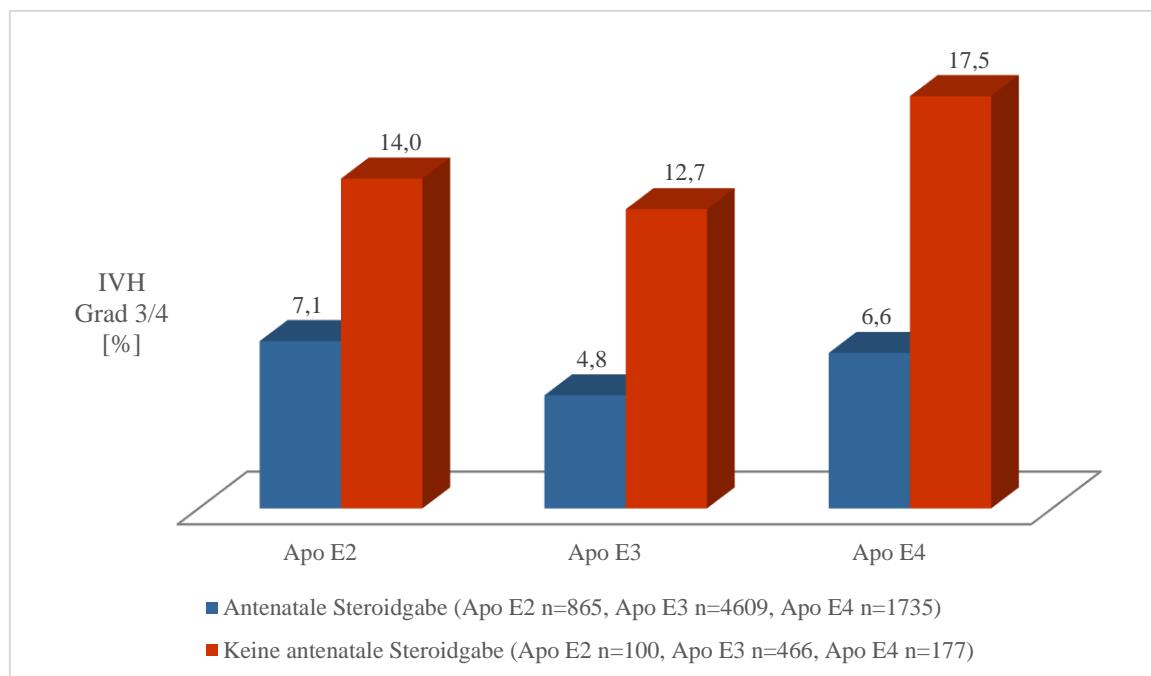


Abbildung 9: IVH Grad 3/4 in Abhängigkeit von antenataler Steroidgabe und Apo E Genotyp

### 3.6 Zusammenhang von Sepsis und Apo E Genotyp

Tabelle 9 untersucht, ob der Apo E Genotyp einen Einfluss auf die Ausbildung einer neonatalen Sepsis hat.

Nach Anpassungen des Signifikanzniveaus nach Bonferroni-Holm zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede im Auftreten einer neonatalen Sepsis in Abhängigkeit vom Apo E Genotyp.

Frühgeborene mit dem Apo E4 Genotyp entwickeln in 34,1 % eine klinische Sepsis, während es unter Frühgeborenen mit Apo E3 Genotyp 31,4 % sind. Dabei handelt es sich jedoch nicht um einen signifikanten Unterschied (nominal:  $p = 0,036$ , adjustiert:  $p = 0,072$ ). Auch Apo E2 zeigt mit 33,6 % kein signifikant gehäuftes Auftreten im Vergleich zu Apo E3 ( $p = 0,200$ ).

Eine Early-Onset-Sepsis findet sich bei Apo E4 mit 1,5 % im Vergleich zu Apo E3 mit 0,9 %. Dabei zeigt sich jedoch ebenfalls keine statistisch signifikante Differenz (nominal:  $p = 0,047$ , adjustiert:  $p = 0,094$ ). Zudem weist auch Apo E2 keinen Unterschied zu Apo E3 auf ( $p = 0,852$ ).

Des Weiteren tritt eine Sepsis mit ErregerNachweis in 14,0 % der Frühgeborenen mit Apo E2 sowie 13,6 % der Frühgeborenen mit Apo E4 auf und findet sich im Vergleich dazu bei 12,8 % der Träger des Apo E3 Genotyps. Auch hier zeigen sich allerdings keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,294$  für E2 vs. E3,  $p = 0,379$  für E3 vs. E4).

Zudem zeigt sich eine gram-negative Sepsis nicht häufiger unter Apo E2 (3,0 % vs. 2,5 %,  $p = 0,377$ ) und Apo E4 (2,9 % vs. 2,5 %,  $p = 0,450$ ) verglichen mit Apo E3.

Eine gram-positive Sepsis tritt bei Apo E2 in 11,9 % auf, während sie mit 10,5 % bei Frühgeborenen mit Apo E3 auftritt. Dennoch handelt es sich auch hierbei nicht um eine signifikante Differenz ( $p = 0,211$ ) und gleichermaßen zeigt sich auch für Apo E4 im Vergleich zu Apo E3 keine Häufung ( $p = 0,663$ ).

Darüber hinaus lassen sich in den weiteren Subgruppen (gram positive Sepsis (ohne Staph. epi.) sowie Candida-Sepsis) ebenfalls keine Unterschiede feststellen.

Tabelle 9: Sepsis in Abhangigkeit vom Apo E Genotyp

	<b>Apo E2 (n = 965)</b>	<b>Apo E3 (n = 5075)</b>	<b>Apo E4 (n = 1912)</b>	<b>p<sup>#</sup> E3 vs. E2</b>	<b>p<sup>#</sup> E3 vs. E4</b>
Sepsis (klinisch) [%]	33,6 (n = 965)	31,4 (n = 5069)	34,1 (n = 1911)	0,200	0,036
Sepsis mit Erreger nachweis [%]	14,0 (n = 956)	12,8 (n = 5036)	13,6 (n = 1903)	0,294	0,379
Early-Onset- Sepsis [%]	0,9 (n = 955)	0,9 (n = 5035)	1,5 (n = 1901)	0,852	0,047
Gram-negative Sepsis [%]	3,0 (n = 956)	2,5 (n = 5036)	2,9 (n = 1903)	0,377	0,450
Gram-positive Sepsis [%]	11,9 (n = 956)	10,5 (n = 5036)	10,9 (n = 1903)	0,211	0,663
Gram-positive Sepsis (ohne Staph. epi.) [%]	2,7 (n = 956)	2,9 (n = 5036)	2,9 (n = 1903)	0,833	> 0,999
Candida-Sepsis [%]	0,5 (n = 956)	0,4 (n = 5036)	0,3 (n = 1903)	0,573	0,647

# exakter Test nach Fisher

## **4 Diskussion**

Prospektive Kohortenstudien besitzen auf Grund der Verwendung standardisierter Tests und Fragebögen sowie der Festlegung klar definierter Endpunkte eine hohe Reproduzierbarkeit. Im GNN wird eine hohe Qualität der Daten durch die Schulung der Mitarbeiter der teilnehmenden Kliniken gewährleistet. Zudem trägt auch die doppelt kontrollierte Dateneingabe und die halbjährliche Überprüfung durch die Studienzentrale zu einer hohen Güte der erhobenen Daten bei. Da im GNN Kinder aus 53 Kliniken aus ganz Deutschland eingeschlossen werden, können geographische Schwankungen in Bezug auf Krankheitshäufigkeiten und Therapieunterschiede ausgeglichen werden. Eine der Stärken der vorliegenden Arbeit besteht außerdem in der großen Kohorte von 7 952 Frühgeborenen. Dennoch können Kohortenstudien keine kausalen Zusammenhänge aufdecken, sondern beschreiben lediglich Assoziationen. Zudem bezieht sich die vorliegende Arbeit zu einem Großteil auf Kinder mit einer mütterlichen Herkunft aus Deutschland (73 %). Es ist somit nicht sicher, inwiefern die Ergebnisse auf Gruppen anderer ethnischer Herkunft übertragbar sind. Insbesondere Angaben zur Verteilung genetischer Merkmale müssen deshalb vor diesem Hintergrund interpretiert werden.

Bei der DNA-Isolierung und Genotypisierung kann es zu Übertragungs- und Pipettierfehlern kommen, die das Ergebnis verfälschen können. Die doppelte Bestimmung einzelner Werte minimiert allerdings solche zufälligen Fehler bei der Genotypisierung. Und auch die Bestimmung von Leerwerten bietet die Möglichkeit, Kontaminationen zu erkennen. Zudem ermöglichen die im Labor etablierten und standardisiert durchgeführten Methoden eine gute Reproduzierbarkeit.

## 4.1 Verteilung der Apo E Allele

Die vorliegende Arbeit konnte bei 7 952 Frühgeborenen Häufigkeiten der Apo E Allele von 7,3 % für Apo E2, 79,9 % für Apo E3 sowie 12,8 % für Apo E4 zeigen.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der weltweiten Verteilung von Apo E. Corbo und Scacchi beschrieben Häufigkeiten von 7 % bei Apo E2, 78 % bei Apo E3 und 15 % bei Apo E4 an einer großen Kohorte von 30 148 Individuen (Corbo und Scacchi, 1999). Andere Studien ermittelten ähnliche Ergebnisse und machten Angaben von 7 – 8 % für Apo E2, 77 – 79 % für Apo E3 und 13 – 15 % für Apo E4 (Wilson et al., 1994; Roses, 1996; Singh et al., 2006; Eisenberg et al., 2010; Kern et al., 2015).

Beim Vergleich der von uns ermittelten Häufigkeiten mit der Verteilung von Apo E bei Hundertjährigen zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede. So trat Apo E4 bei Hundertjährigen mit 5 – 11 % seltener auf. Hingegen ergab sich sowohl für Apo E2 mit 7 – 11 % als auch für Apo E3 mit 79 – 88 % ein gleich häufiges oder häufigeres Auftreten (Gondo et al., 2006; Robine et al., 2010; Sonnega et al., 2014; Sebastiani et al., 2019).

Ob Neugeborene eine andere Verteilung als höhere Altersgruppen zeigen, war Gegenstand zahlreicher Studien. Becher et al. untersuchten die Verteilung von Apo E bei Neugeborenen und Kindern und verglichen sie mit den Häufigkeiten für Apo E bei Erwachsenen. Es zeigten sich signifikante Unterschiede für Apo E3 und Apo E4. Während Apo E3 bei Erwachsenen mit 77 % angegeben war, trat dieses Allel bei Kindern mit 72 % seltener auf. Gleichzeitig zeigten sie mit 19 % ein vermehrtes Auftreten des Apo E4 Allels, das bei Erwachsenen in 15 % der Fälle auftrat. Häufigkeiten für Apo E2 unterschieden sich zwischen den beiden Gruppen nicht und lagen jeweils bei 8 % (Becher et al., 2005). Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch eine andere Forschungsgruppe, die eine Zunahme des Apo E3 Allels bei gleichzeitiger Abnahme von Apo E4 mit dem Alter feststellte (Payami et al., 2005). Allerdings gibt es auch Studien, die eine ähnliche Verteilung von Apo E bei Neugeborenen im Vergleich zu Erwachsenen berichteten (McMichael et al., 2008). Insgesamt reichen die Angaben der Allelfrequenzen bei Kindern für Apo E2 von 3 – 10 %, für Apo E3 von 58 – 88 % und für Apo E4 von 8 – 35 %. Dabei ist allerdings zu bedenken, dass eine Vielzahl dieser Angaben auf die Untersuchung kleiner Studienkohorten zurückzuführen ist (Descamps et al., 2004; Becher et al., 2005; Payami et al., 2005; Kuroda et al., 2007; McMichael et al., 2008; Korja et al., 2013; Lavenex et al., 2016). In zahlreichen Studien mit großen Fallzahlen konnte hingegen gezeigt werden, dass Apo E4 mit einer kürzeren Lebensdauer assoziiert ist (Schächter et al., 1994; Garatachea et al., 2014; Broer et al., 2015;

Garatachea et al., 2015; Deelen et al., 2019; Sebastiani et al., 2019). Es wird dabei eine um mehr als sechs Jahre verringerte Lebenserwartung für Apo E4 angegeben (Raichlen und Alexander, 2014).

Insgesamt ist das von uns gefundene häufigere Auftreten von Apo E4 bei Neugeborenen im Vergleich zu Hundertjährigen – unter Betrachtung der kürzeren Lebensdauer bei Apo E4 – wahrscheinlich. Zur erhöhten Mortalität von Trägern des Apo E4 Allels könnte in diesem Zusammenhang das erhöhte Risiko für Hirnblutungen bei Frühgeborenen beitragen, das in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnte.

Allerdings konnten wir eine abweichende Verteilung von Apo E bei Neugeborenen im Vergleich zur Gesamtheit der Erwachsenen nicht bestätigen. Zum besseren Verständnis werden deshalb weitere Studien mit großen Fallzahlen benötigt, die die Häufigkeiten der Apo E Allele bei Neugeborenen untersuchen. Zudem schließt die vorliegende Arbeit zu einem Großteil Daten von Kindern deutscher Herkunft ein, während als Vergleich Studien zur weltweiten Verteilung dienten. Um die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Häufigkeiten besser vergleichen zu können, werden deshalb Studien zur Verteilung von Apo E in höheren Altersgruppen in Deutschland benötigt.

Um den Zusammenhang der Apo E Allelfrequenz und der ethnischen Herkunft genauer zu erforschen, unterteilten wir unsere Kohorte nach der Herkunft der Mütter. Es zeigte sich, dass 73 % der Kinder Mütter deutscher Herkunft haben und diese Kinder häufiger als andere Gruppen Träger des Apo E2 oder Apo E4 Allels sind sowie seltener Apo E3 aufweisen. Die Häufigkeiten in dieser Subgruppe lagen bei 7,7 % für Apo E2, 78,8 % für Apo E3 und 13,5 % für Apo E4. Bestätigt werden unsere Ergebnisse von Koch et al., die ähnliche Häufigkeiten bei 2 349 Deutschen fanden, wobei sich die Allele mit 7,3 % auf Apo E2, 78,4 % auf Apo E3 und 14,3 % auf Apo E4 verteilten (Koch et al., 2002). Und auch Corbo und Scacchi gaben in ihrer Studie mit 7,7 % für Apo E2, 77,8 % für Apo E3 sowie 14,5 % für Apo E4 ähnliche Häufigkeiten an (Corbo und Scacchi, 1999).

Beim Vergleich der Verteilung der Apo E Allele im Hinblick auf die weiteren Subgruppen zeigen sich in der Literatur vergleichbare Ergebnisse im Rahmen einer mütterlichen Herkunft aus Europa oder dem Nahen Osten, während deutliche Abweichungen bei Kindern mit afrikanischer und asiatischer mütterlicher Herkunft beobachtet werden.

So fanden sich in unseren Kohorte Allelfrequenzen von 6,3 % für Apo E2, 81,6 % für Apo E3 und 12,1 % für Apo E4 bei Frühgeborenen mit mütterlicher Herkunft aus dem restlichen Europa einschließlich Russland. In der Literatur bewegen sich die Häufigkeiten in Bereichen von 7 – 8 % für Apo E2, 79 – 81 % für Apo E3 und 12 – 13 % für Apo E4 und

unterstützen damit unsere Ergebnisse.

Auch eine Verteilung von 6,1 % für Apo E2, 86,1 % für Apo E3 und 7,8 % für Apo E4 bei Kindern mit einer mütterlichen Herkunft aus dem Nahen Osten wird in Studien bestätigt. Hier liegen die Allelfrequenzen bei 6 – 8 % für Apo E2, 86 % für Apo E3 und 6 – 8 % für Apo E4.

Bei einer mütterlichen Herkunft aus Asien zeigten sich in unserer Population mit 3,7 % Apo E2, 82,8 % Apo E3 und 13,5 % Apo E4. Während Apo E3 mit 82 – 85 % eine vergleichbare Allelfrequenz in der Literatur aufweist, kann das seltene Auftreten des Apo E2 Allels und eine Häufung des Apo E4 Allels nicht bestätigt werden. So gaben Corbo und Scacchi Allelfrequenzen von 7,5 % für Apo E2 und 10,9 % für Apo E4 unter Asiaten an. Singh et al. bezifferten die Häufigkeiten auf 6,3 % für Apo E2 und 9,0 % für Apo E4.

Im Rahmen einer afrikanischen Herkunft trat in unserer Kohorte mit 8,1 % Apo E2, 78,0 % Apo E3 und 13,9 % Apo E4 auf. Die Häufigkeit von Apo E2 findet sich in der Literatur wieder und ist hier mit 7 – 10 % angegeben. Die anderen beiden Allele zeigen jedoch abweichende Verteilungen. Singh et al. beschrieben dabei Häufigkeiten von 69,0 % für Apo E3 und 20,9 % für Apo E4. Und auch Corbo und Scacchi machten Angaben von 68,5 % für Apo E3 und 24,0 % für Apo E4 (Corbo und Scacchi, 1999; Singh et al., 2006).

Während sich bei Kindern mit einer mütterlichen Herkunft aus Deutschland, Europa oder dem Nahen Osten also vergleichbare Verteilungen zeigen, weichen die von uns gefundenen Verteilungen bei asiatischer oder afrikanischer Herkunft der Mütter deutlich von den in der Literatur gefundenen ab. Diese Abweichungen könnten dabei auf die geringeren Fallzahlen in diesen Subgruppen zurückgeführt werden. Während die ersten drei Subgruppen 5 804, 852 bzw. 604 Frühgeborene beinhalten, wurden lediglich 363 Frühgeborenen mit afrikanischer Herkunft der Mutter und 173 Kinder mit Müttern asiatischer Herkunft eingeschlossen.

Zum besseren Verständnis bedarf es Untersuchungen an Studienpopulationen verschiedener ethnischer Herkunft mit größeren Fallzahlen.

## 4.2 Klinische Daten in Bezug auf den Apo E Genotyp

Der Zusammenhang des Apo E Genotyps mit dem Auftreten eines beeinträchtigten intrauterinen Wachstums und einer Geburt als SGA stellt sich in der Literatur kontrovers dar.

Wir konnten in unseren Untersuchungen zeigen, dass Frühgeborene mit dem Apo E2 Genotyp seltener als SGA geboren werden. Unsere Untersuchungen werden von einer Studie von Infante-Rivard et al. an 449 Neugeborenen unterstützt, die ebenfalls einen protektiven Effekt von Apo E2 gegenüber einem beeinträchtigtem intrauterinem Wachstum feststellten (Infante-Rivard et al., 2003).

In einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe an 4 885 VLBW-Frühgeborenen konnten wir hingegen keinen Einfluss des Apo E Genotyps auf ein beeinträchtigtes Wachstum bei Geburt feststellen (Norda et al., 2017). Und auch Akisu et al. fanden keinen solchen Zusammenhang. Allerdings wurden in dieser Studie nur Reifgeborene untersucht und die Kohorte war mit 80 Kindern sehr klein (Akisu et al., 2004). Eine weitere Studie an 139 Kindern fand ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen Apo E und einem niedrigen GG, allerdings fehlten in dieser Studie Angaben zu SGA (Szitányi et al., 2008).

Eine mögliche Erklärung für einen Einfluss des Apo E Genotyps könnte ein veränderter Fettstoffwechsel in Abhängigkeit des Apo Genotyps mit in der Folge beeinträchtigtem intrauterinem Wachstum darstellen (Norda et al., 2017). Während einerseits ein gestörtes intrauterines Wachstum mit erniedrigtem HDL und erhöhtem LDL assoziiert ist (Pecks et al., 2012), zeigt andererseits Apo E2 einen gegenteiligen, vorteilhaften Effekt mit erhöhtem HDL und erniedrigtem LDL im Nabelschnurblut (Descamps et al., 2004). Dieser Zusammenhang könnte einen protektiven Effekt von Apo E2 gegenüber einer Geburt als SGA erklären.

## 4.3 IVH

### 4.3.1 Einfluss des Apo E Genotyps auf die IVH

In der von uns untersuchten Population trat eine IVH mit einer Häufigkeit von 18,3 % auf. Damit liegt die Häufigkeit in einem Bereich, der in anderen Studien berichtet wurde. Je nach Studie zeigten sich dabei Häufigkeiten von 15 – 25 % für VLBW-Frühgeborene (Robinson, 2012; Szpecht et al., 2015; Wei et al., 2016; Handley et al., 2018). Eine weitere Studie an Frühgeborenen in Deutschland gab ebenfalls eine Inzidenz der IVH unter VLBW-Frühgeborenen von 20 % an (Vogtmann et al., 2012).

Die Hirnblutungen in unserer Kohorte verteilten sich mit 40,4 % auf Grad 1, 25,1 % auf Grad 2, 16,4 % auf Grad 3 und 18,1 % auf Grad 4. Diese Verteilung findet sich in ähnlicher Weise in der Literatur wieder. Christian et al. gaben 49 % für Grad 1, 20 % für Grad 2, 15 % für Grad 3 und 16 % für Grad 4 an (Christian et al., 2015). Und auch in einer deutschen Kohorte fand sich mit 32 % für Grad 1, 26 % für Grad 2 und 42 % für Grad 3 und 4 zusammen eine vergleichbare Verteilung, auch wenn in dieser Vergleichskohorte vermehrt schwere Hirnblutungen auftraten (Vogtmann et al., 2012).

Sowohl Träger von Apo E2 als auch von Apo E4 erkrankten in unserer Studienpopulation signifikant häufiger an einer IVH. Insbesondere schwere IVHs traten gehäuft auf. Die OR für das Vorkommen einer schweren IVH bei Apo E2 und Apo E4 betrug dabei jeweils 1,4. In der Literatur wurde bisher nicht über einen Zusammenhang zwischen den Apo E Polymorphismen und dem Risiko für eine IVH berichtet. 43 % des IVH-Risikos sollen jedoch auf Umweltfaktoren und genetische Faktoren entfallen (Bhandari et al., 2006). Ådén et al. untersuchten dabei den genetischen Einfluss, allerdings zeigte sich nur die Methylentetrahydrofolatreduktase als signifikanter Einflussfaktor (Ådén et al., 2013).

Der Einfluss von Apo E auf IZBs bei Erwachsenen war hingegen Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. In Abhängigkeit des Blutungstyps – lobäre oder nicht-lobäre Blutung – zeigten sich dabei verschiedene Ergebnisse.

Die Betrachtung älterer Studien mit kleinen Fallzahlen ergibt inkonsistente Resultate. Während einige Studien keine Assoziationen zwischen dem Apo E Genotyp und dem Risiko für die Entwicklung einer IZB fanden (Catto et al., 2000; Chowdhury et al., 2001; Duzenli et al., 2004), zeigten Kokubo et al. an 201 Patienten ein erhöhtes Risiko für IZBs bei Apo E2 und Apo E4 (Kokubo et al., 2000). Hingegen konnten Tzourio et al. nur Apo E2 mit einem erhöhten Risiko für eine IZB in Verbindung bringen (Tzourio et al., 2008), Woo et al. fanden

wiederum eine Assoziation zwischen Apo E4 und lobären Blutungen (Woo et al., 2005). Fünf Studien mit großen Fallzahlen wiesen schädliche Effekte für Apo E2 und Apo E4 im Hinblick auf lobäre IZBs nach, allerdings zeigten auch sie keine vollständig einheitlichen Ergebnisse. In einer Metaanalyse von Sudlow et al. stellte sich bei 23 926 eingeschlossenen Fällen Apo E2 als Risikofaktor für die Entwicklung einer lobären IZB heraus. Für Apo E4 konnte ebenfalls eine Risikoerhöhung gefunden werden, diese war allerdings nicht signifikant (Sudlow et al., 2006).

Zhang et al. konnten dagegen in einer Metaanalyse von 4 813 Fällen Apo E4 mit einem erhöhten Risiko für lobäre IZBs in Verbindung bringen, während Apo E2 zwar ein erhöhtes Risiko aufwies, dieses aber nicht signifikant war (Zhang et al., 2014). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Chen et al., die an 4 161 Fällen ebenfalls ein erhöhtes Risiko für Apo E4, nicht jedoch für Apo E2 fanden (Chen und Hu, 2016).

Hingegen zeigte sich in einer Studie von Peck et al. an 4 907 Individuen, dass sowohl Apo E2 als auch Apo E4 mit einem erhöhten Risiko für eine lobäre IZB assoziiert ist (Peck et al., 2008). Auch Biffi et al. konnten einen Effekt beider Genotypen auf das Risiko einer lobären IZB an 6 230 Patienten nachweisen. Zudem wurde in dieser Studie auch ein erhöhtes Risiko für nicht-lobäre IZBs bei Apo E4 gefunden (Biffi et al., 2010).

Die OR für das Auftreten einer schweren IVH betrug sowohl für Apo E2 als auch für Apo E4 1,4. Der Vergleich mit den ORs bei IZBs im Erwachsenenalter wird dadurch erschwert, dass entweder ORs als Vergleich dienen können, die sich auf die Gesamtheit der IZBs beziehen oder solche, die Subgruppen der lobären und nicht-lobären IZBs betrachten. Werden die ORs verwendet, die nicht zwischen den Subgruppen unterscheiden, so zeigen sich mit unseren Ergebnissen vergleichbare ORs. Sie liegen im Bereich von 1,3 – 1,4, lediglich eine Studie gab eine OR von 2,1 für das erhöhte Risiko einer IZB bei Apo E4 an. Bei Betrachtung der ORs bezogen auf die Subgruppen zeigen sich allerdings ORs von 1,8 – 2,4 für die Assoziation von Apo E2 mit lobären IZBs, 1,5 – 2,2 für die Assoziation von Apo E4 mit lobären IZBs und 1,2 für die Assoziation von Apo E4 mit nicht-lobären IZBs. Die zum Vergleich verwendeten ORs wurden dabei den fünf Studien zu IZBs mit großen Fallzahlen entnommen, kleinere Studien wurden nicht berücksichtigt (Sudlow et al., 2006; Peck et al., 2008; Biffi et al., 2010; Zhang et al., 2014; Chen und Hu, 2016).

Wir konnten in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der Apo E Genotyp nicht nur mit einem häufigeren Auftreten einer IVH, sondern auch mit einem schlechteren Verlauf assoziiert ist. Schwere IVHs machten 38,7 % der IVHs unter Apo E2 Trägern und 38,6 % der IVHs unter Apo E4 Trägern aus, während sich bei Apo E3 nur in 31,8 % eine schwere IVH entwickelte.

Dieser Unterschied war lediglich für Apo E4, nicht jedoch für Apo E2 signifikant. Allerdings lässt sich dieser Zusammenhang auf die geringere Zahl Frühgeborener mit Apo E2 Genotyp zurückführen, die zu einer geringeren absoluten Zahl der IVHs in dieser Gruppe führt. Während sich unter Frühgeborenen mit dem Apo E2 Genotyp 194 Kinder mit IVH zeigten, waren es unter Frühgeborenen mit Apo E4 Genotyp 378 Fälle.

In einer Studie an 2 015 Erwachsenen war der Apo E2 Genotyp mit einem schlechteren Verlauf nach lobärer IZB assoziiert. Apo E2 Träger zeigten durchschnittlich ein 5,3 ml höheres Blutungsvolumen, eine erhöhte Mortalität und ein schlechteres Outcome 90 Tage nach der Blutung. Im Gegensatz dazu konnte für Apo E4 kein Effekt festgestellt werden (Biffi et al., 2011). Brouwers et al. stellten in einer weiteren Studie ebenfalls eine größere Ausdehnung des entstehenden Hämatoms bei Patienten mit Apo E2 und lobärer IZB fest (Brouwers et al., 2012). Biffi et al. beschrieben hingegen einen deutlich stärkeren langfristigen neurologischen Abbau nach einer Hirnblutung bei Trägern des Apo E4 Genotyps (Biffi et al., 2016). Ältere Studien hatten zudem Apo E4 mit einer höheren Mortalität nach IZB in Verbindung gebracht, während jedoch andere Studien kein signifikantes Ergebnis zeigten. Alle diese Studien hatten allerdings gemeinsam, dass sie an kleinen Kohorten durchgeführt wurden (McCarron et al., 1999; Catto et al., 2000; McCarron et al., 2003; Martínez-González und Sudlow, 2006).

Insgesamt ist der Einfluss des Apo E Genotyps auf IZBs noch nicht vollständig geklärt, dennoch lassen zahlreiche Studien auf einen schädlichen Einfluss sowohl von Apo E2 als auch von Apo E4 schließen.

Während der Zusammenhang von IVH und Apo E noch unbekannt ist, wurde die Auswirkung von Apo E auf das kindliche Gehirn sowie die Beeinflussung zentralnervöser Erkrankungen des Kindes in zahlreichen Studien untersucht.

So wurde der Frage nachgegangen, ob der Apo E Genotyp das neurologische Outcome nach traumatischem Hirnschaden beeinflusst. Auf der einen Seite fanden Quinn et al. keinen Zusammenhang zwischen Apo E und postmortaler Hirschwellung bei 106 Kindern (Quinn et al., 2004). Und auch Reuter-Rice et al. konnten unter 60 Kindern keine Assoziation von Apo E mit dem Outcome nach traumatischem Hirnschaden feststellen (Reuter-Rice et al., 2018). In weiteren Studien wurde zudem kein eindeutiges Ergebnis für einen Effekt von Apo E gefunden (Lo et al., 2009; Moran et al., 2009; Treble-Barna et al., 2016). Eine nicht publizierte Studie an 71 Kindern zeigte sogar ein besseres neurologisches Outcome für Kinder mit Apo E4, allerdings lag die Häufigkeit von Apo E4 in dieser Studie nur bei 4 %, was die Aussagekraft limitiert (Blackman et al., 2005).

Dagegen wurde in einer Studie an einer großen Kohorte von 1 094 Teilnehmern im Alter von 0 – 93 Jahren in der Subgruppe der Kinder unter 15 Jahren ein schlechteres Outcome für Träger des Apo E4 Genotyps gefunden (Teasdale et al., 2005). Zudem berichteten auch Brichtová und Kozák in einer Studie an 70 Kindern von einem schlechteren Outcome (Brichtová und Kozák, 2008).

Zwei Metaanalysen zeigten ebenfalls einen schädlichen Effekt für den Apo E4 Genotyp. Die neuere von Kassam et al. schloss sechs Studien und 358 Kinder ein und fand ein schlechteres neurologisches Outcome sechs Monate nach dem Trauma (Kassam et al., 2016). Und auch Kurowski et al. kamen in ihrer Metaanalyse, die 347 Kinder einbezog, zu dem gleichen Ergebnis (Kurowski et al., 2012).

Ein Einfluss von Apo E auf das neurologische Outcome wurde außerdem bei Kindern festgestellt, die an angeborenen Herzfehlern operiert wurden. Allerdings zeigte sich hier ein schlechteres Outcome für den Apo E2 Genotyp (Gaynor et al., 2003; Gaynor et al., 2014).

Der Apo E Genotyp hat zudem einen Einfluss auf das Risiko für eine CP. So fanden Kuroda et al. sowohl für Apo E2 als auch für Apo E4 ein erhöhtes CP-Risiko (Kuroda et al., 2007). Und auch Braga et al. zeigten, dass Apo E2 ein Risikofaktor für die Entwicklung einer CP ist, für Apo E4 wurde jedoch kein solcher Zusammenhang gefunden (Braga et al., 2009). Allerdings konnte an einer großen Kohorte mit 1 741 Kindern kein SNP, auch kein Apo E betreffender SNP, mit einer CP assoziiert werden (O'Callaghan et al., 2012). Die Auswirkung des Apo E Genotyps auf den Verlauf der Erkrankung ist ebenfalls nicht eindeutig. So zeigten Blackman et al., dass Apo E4 mit einem besseren motorischen Outcome assoziiert ist, allerdings ohne Signifikanz (Blackman et al., 2009), während Lien et al. unter 255 Kindern mit CP feststellten, dass Apo E4 signifikant häufiger zu Epilepsie und parenteraler Ernährung führt (Lien et al., 2013).

Schließlich wurde Apo E auch im Hinblick auf die neurokognitive Entwicklung gesunder Kinder untersucht. Einige Autoren schlugen dabei einen positiven Einfluss von Apo E4 auf die neurokognitive Entwicklung vor (Wright et al., 2003; Blackman et al., 2005; Oriá et al., 2005). Blackman et al. stellten die Hypothese auf, dass Apo E4 zwar bei Älteren einen schädlichen Effekt habe, in jungen Jahren aber protektiv sei (Blackman et al., 2005). Dies wurde bereits in einer Arbeit von Corbo und Scacchi vorgeschlagen (Corbo und Scacchi, 1999). Allerdings lagen den Studien, die einen protektiven Effekt von Apo E4 aufzeigten, kleine Studienkohorten zu Grunde. Zudem konnte die These in Folgestudien nicht bestätigt werden. Unter ELBW-Frühgeborenen konnten keine entwicklungsneurologischen Unterschiede zwischen den Apo E Genotypen festgestellt werden (Blackman et al., 2014).

Auch eine Studie von Korja et al. unter 322 Kindern wies keine Assoziation zwischen Apo E und der neurokognitiven Entwicklung nach (Korja et al., 2013). Des Weiteren konnte eine Metaanalyse von 11 098 Kindern zeigen, dass Apo E4 keinen Einfluss auf die Entwicklung kognitiver Fähigkeiten hat (Ihle et al., 2012).

Das erhöhte Risiko für eine IVH in Abhängigkeit des Apo E Genotyps könnte durch einen schädlichen Effekt von Apo E4 auf zahlreiche Abläufe im ZNS bedingt sein. So zeigt sich bei Apo E4 – wie bereits in der Einleitung beschrieben – verglichen mit Apo E3 eine Verstärkung inflammatorischer Prozesse, eine erhöhte Apoptoserate, ein beeinträchtigtes axonales Wachstum, eine beeinträchtigte Aussprossung von Neuriten, eine beeinträchtigte Synapsen-Synthese sowie ein beeinträchtigter Glucose-Metabolismus und eine mitochondriale Dysfunktion (Mahley et al., 2006; Vance und Hayashi, 2010; Mahley und Huang, 2012). Zudem lassen sich eine Schädigung von Mitochondrien und Zytoskelett im Rahmen einer ineffektiven Reparatur beschädigter Zellen durch Apo E4 finden. Apo E trägt bei Zellschädigung über den Transport von Lipiden zur Reparatur von Membranen bei. Apo E4 wird hierbei allerdings intrazellulär vermehrt zu neurotoxischen Fragmenten abgebaut, die die Zelle schädigen (Snipes et al., 1986; Mahley und Huang, 2012).

Die Mechanismen, die das erhöhte Hirnblutungs-Risiko von Apo E2 und Apo E4 bei Erwachsenen bedingen, sind noch nicht eindeutig geklärt. Je nach Blutungstyp spielen degenerative Gefäßschäden wie die Ablagerungen von Amyloid  $\beta$  bzw. eine arterielle Hypertonie eine Rolle (Carpenter et al., 2016), wobei insbesondere Apo E4 eine verstärkte Ablagerung und einen verminderten Abbau des Amyloid  $\beta$  begünstigen soll (Rannikmäe et al., 2014). Zudem ist Apo E4 mit einem erhöhten Risiko für eine arterielle Hypertonie assoziiert (Niu et al., 2009).

Degenerative Gefäßschäden durch Amyloid  $\beta$  Ablagerung – die bei Erwachsenen nicht nur im Rahmen eines erhöhten Risikos für IZBs, sondern auch im Rahmen der Alzheimer Erkrankung durch Apo E2 und Apo E4 gefunden wurden – spielen bei Kindern zwar eine eher untergeordnete Rolle, dennoch könnten die Mechanismen, die zu IVHs bzw. degenerativen Gefäßschäden und deren Folgeerscheinungen führen, ähnlich sein. So wiesen 2 – 6 Monate alte Kinder mit Apo E4 in Magnetresonanztomographie (MRT) – Untersuchungen einen geringeren Myelin Gehalt der weißen Substanz sowie ein geringeres Volumen an grauer Substanz in Bereichen auf, in denen sich Veränderungen bei der Alzheimer Erkrankung zeigen (Dean et al., 2014).

Apo E ist am Transport von fettlöslichem Vitamin K beteiligt. Neugeborene weisen einen Mangel an Vitamin K auf und erhalten deshalb nach der Geburt Vitamin K verabreicht, da

ein Mangel dieses Vitamins das Blutungsrisiko erhöht. Eine beeinträchtigte Funktion von Apo E2 und Apo E4 könnte sich in einem veränderten Transport von Vitamin K äußern und damit das erhöhte Hirnblutungs-Risiko dieser Apo E Genotypen erklären. Falcone et al. berichteten allerdings, dass die Apo E Genotypen und eine Behandlung mit Warfarin – welches als Vitamin K Antagonist zu einem Vitamin K Mangel führen kann – das Risiko für Hirnblutungen unabhängig voneinander erhöhen (Falcone et al., 2014).

Insgesamt ist der von uns gefundene negative Einfluss der Apo E2 und Apo E4 Genotypen auf die Entwicklung einer IVH wahrscheinlich, auch wenn der molekulare Mechanismus der Risikoerhöhung unklar ist. Einerseits beeinflusst der Apo E Genotyp das Hirnblutungs-Risiko bei Erwachsenen, andererseits spielen Apo E2 und Apo E4 eine schädigende Rolle im ZNS von Kindern. Allerdings bedarf es sowohl bei der Untersuchung des Einflusses von Apo E auf eine IVH als auch auf andere neurologische Erkrankungen im Kindesalter weitere Studien.

Die Identifikation genetischer Einflussfaktoren bietet dabei auf lange Sicht die Möglichkeit, sowohl Krankheiten frühzeitig zu erkennen und präventiv behandeln zu können als auch eine gezielte Therapie auf genetischer Grundlage zu entwickeln (Namath und Patterson, 2009; Grimm et al., 2011). Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein von Apo E abgeleitetes Peptid den frühen Hirnschaden im Mausmodell verringert (Wu et al., 2016). Ein weiteres von Apo E abgeleitetes Peptid wurde erfolgreich in einer Phase-1-Studie an gesunden Probanden getestet und eine Therapie von IZBs bei Erwachsenen auf Grundlage von Apo E scheint möglich (Guptill et al., 2017).

Zwischen der Anzahl an Apo E-Polymorphismen und dem Auftreten einer schweren IVH zeigte sich ein dosisabhängiger Effekt. Je mehr Apo E2- und Apo E4-Allele vorhanden waren, desto häufiger trat eine schwere IVH auf. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Studien bei Erwachsenen, die ebenfalls ein dosisabhängiges genetisches Modell für die Beziehung zwischen Apo E und IZBs vorschlagen, während ein dominantes sowie ein rezessives Modell abgelehnt werden (Biffi et al., 2010; Biffi et al., 2011).

### **4.3.2 Einfluss des Apo E Genotyps auf die PVL**

In unserer Studienpopulation erkrankten Kinder mit Apo E2 Genotyp signifikant häufiger an einer PVL. Zudem zeigte sich auch ein gehäuftes Auftreten einer PVL bei Apo E4, allerdings ohne Signifikanz. Wir konnten zeigen, dass das häufigere Auftreten der PVL nicht auf die vermehrte Anzahl an IVHs zurückzuführen ist, denn auch in der Subgruppe der

Kinder ohne IVH trat eine PVL signifikant häufiger bei Apo E2 auf.

Die Studienlage zum Zusammenhang von Apo E und PVL ist rar. Lediglich Galli et al. untersuchten 98 Kinder, konnten aber keine Assoziation zwischen dem Apo E Genotyp und dem Auftreten einer PVL feststellen. Allerdings begrenzt die kleine Studienkohorte die Aussagekraft der Studie (Galli et al., 2004).

Bei der PVL wird die weiße Substanz lateral der Ventrikel beschädigt. Betrachtet man Studien bei Erwachsenen, so zeigen einige einen Zusammenhang zwischen einer Schädigung der weißen Substanz und Apo E. Bei nicht-dementen Erwachsenen zwischen 65 und 80 Jahren konnten vermehrte Läsionen der weißen Substanz – auch der periventrikulären – bei Trägern des Apo E4 Genotyps festgestellt werden (Godin et al., 2009). Und auch Wen et al. konnten bei Patienten mit lakunären Infarkten Veränderungen der weißen Substanz bei Apo E4 nachweisen (Wen et al., 2006). Hingegen fanden Lemmens et al. verstärkte Schäden der weißen Substanz bei Patienten mit Schlaganfall, die den Apo E2 Genotyp aufwiesen (Lemmens et al., 2007). Darüber hinaus zeigten Westlye et al. in MRT Untersuchungen, dass unter Apo E2 und Apo E4 Veränderungen an der weißen Substanz im Vergleich zu Apo E3 vorliegen. Diese Veränderungen zeigten keine Assoziation mit dem Alter, bestehen also schon in jüngeren Jahren und zeigen mögliche frühe Veränderungen der weißen Substanz in Abhängigkeit der Apo E Polymorphismen (Westlye et al., 2012). Frühe Veränderungen der weißen Substanz berichteten auch Dean et al., die bei Kindern mit Apo E4 einen geringeren Myelin Gehalt in einzelnen Hirnarealen nachwiesen (Dean et al., 2014).

Ein gehäuftes Auftreten der PVL in Bezug auf den Apo E2 oder Apo E4 Genotyp scheint auch unter Betrachtung der schädlichen zentralnervösen Einflüsse bei Kindern plausibel, wie sie im vorherigen Abschnitt beschrieben wurden (siehe 4.3.1 Einfluss des Apo E Genotyps auf die IVH). Dennoch werden auf Grund der spärlichen Datenlage in Bezug auf die PVL künftige Studien zeigen müssen, ob sich der von uns gefundene Zusammenhang bestätigt.

### **4.3.3 Risikofaktoren für eine IVH**

In der vorliegenden Arbeit konnten wir das männliche Geschlecht, ein niedriges GA, einen niedrigen Apgar, eine tracheale Beatmung, einen Pneumothorax und einen Mehrlingsstatus als Risikofaktoren für eine schwere IVH bestätigen. Eine antenatale Steroidgabe sowie eine Geburt als SGA stellte sich als protektiv heraus, während ein Einfluss der Herkunft der Mutter nicht festgestellt werden konnte. Außerdem zeigte sich, dass Apo E2 und Apo E4 auch nach der logistischen Regression als Risikofaktoren bestehen bleiben.

Diese Zusammenhänge lassen sich in der vorhandenen Literatur größtenteils bestätigen. So wurde ein niedriges GA in zahlreichen Studien als Risikofaktor identifiziert (Singh et al., 2013; Shankaran et al., 2014; Ment et al., 2015). Überraschenderweise blieb das GA in einer Studie von Waitz et al. nach logistischer Regression nicht als signifikanter Einflussfaktor bestehen. Die Studie wurde allerdings an einer kleinen Studienpopulation von 279 Kindern erhoben. Zudem wurden Frühgeborenen mit einem  $GA \leq 28$  SSW eingeschlossen und die Autoren diskutierten, ob bei sehr unreifen Frühgeborenen andere Risikofaktoren eine stärkere Rolle spielen als bei reiferen Kindern und somit den Einfluss des GA überwiegen (Waitz et al., 2016). In zukünftigen Studien wäre es somit interessant, zu untersuchen, ob das GA – und auch andere Faktoren – in Abhängigkeit der Unreife des Kindes einen veränderten Einfluss zeigen. Ein niedriges GA ist als Risikofaktor dennoch pathophysiologisch plausibel, da sich die germinale Matrix mit zunehmendem GA zurückbildet und bei Reifgeborenen nicht mehr vorhanden ist (Szymonowicz et al., 1984; Perlman, 2009).

Die Studienlage zum männlichen Geschlecht als Risikofaktor ist nicht eindeutig. So zeigten einige Studien ein erhöhtes IVH-Risiko beim männlichen Geschlecht (Shankaran et al., 1996; Cuestas et al., 2009; Mohamed und Aly, 2010), während Singh et al. in einer Untersuchung an 2 917 Neugeborenen keinen Unterschied des Vorkommens männlicher Neugeborener zwischen den Subgruppen mit oder ohne schwere IVH fanden (Singh et al., 2013). Darüber hinaus zeigte sich bei Ment et al. sowie bei Shankaran et al. zwar eine Häufung männlicher Frühgeborener im Rahmen einer schweren IVH, diese war jedoch nicht signifikant (Shankaran et al., 2014; Ment et al., 2015).

Ein Apgar < 3 mit 5 Minuten war in der vorliegenden Arbeit mit einer Risikoerhöhung verbunden und auch bei Betrachtung der aktuellen Literatur zeigt sich ein niedriger Apgar als Risikofaktor (Singh et al., 2013; Shankaran et al., 2014; Ment et al., 2015; Waitz et al., 2016). Ein von uns gefundenes erhöhtes IVH-Risiko bei Mehrlingen berichteten auch vorherige Studien (O’Shea et al., 1992; Waitz et al., 2016), während sich diese Risikoerhöhung bei Ment et al. als nicht signifikant herausstellte (Ment et al., 2015). In einer weiteren Studie zeigte sich zwar ein erhöhtes IVH-Risiko bei Mehrlingen, allerdings blieb dies bei Betrachtung der Subgruppen nur für Patienten weißer Hautfarbe bestehen, während sich in der Gruppe der Kinder mit afrikanischer Herkunft kein Unterschied mehr zeigte (Shankaran et al., 2014).

Ein Pneumothorax zeigte sich in unserer Arbeit als Risikofaktor für eine IVH. Einige Studien bestätigten diesen Zusammenhang (Shankaran et al., 2014; Ment et al., 2015), jedoch blieb

ein Pneumothorax in einer Studie von Waitz et al. nach logistischer Regression nicht als signifikanter Risikofaktor bestehen. Die Studie wurde allerdings nur an 279 Kindern durchgeführt und das Einschlusskriterium lag bei einem  $GA \leq 28$  SSW (siehe oben, Waitz et al., 2016).

Das erhöhte Risiko im Rahmen einer trachealen Beatmung wird in der aktuellen Literatur bestätigt (Shankaran et al., 2014; Ment et al., 2015; Handley et al., 2018). Die tracheale Beatmung stellte sich in der vorliegenden Arbeit außerdem als stärkster Einflussfaktor des IVH-Risikos heraus. Ment et al. konnten eine endotracheale Beatmung ebenfalls – zusammen mit einem niedrigen Apgar – als bedeutendsten Einflussfaktor identifizieren (Ment et al., 2015). Handley et al. berichteten zudem, dass der Rückgang der Inzidenz der IVH in Kalifornien zu 46 % auf Patientenfaktoren zurückzuführen sei, wobei eine verminderte Intubation unter den Einflussfaktoren den größten Anteil an diesem Rückgang hatte (Handley et al., 2018). Eine endotracheale Beatmung soll – wie auch ein Pneumothorax – zu einer Drucksteigerung im venösen System führen und so die Entwicklung einer IVH begünstigen (Robinson, 2012; Speer, 2013).

Eine Geburt als SGA stellte sich als protektiv gegenüber einer Hirnblutung heraus. Heuchan et al. konnten ebenfalls eine intrauterine Wachstumsverzögerung mit einem geringeren Risiko für eine IVH assoziieren (Heuchan et al., 2002). Und auch Waitz et al. stellten ein signifikant geringeres Auftreten einer Geburt als SGA unter Neugeborenen mit einer IVH fest (Waitz et al., 2016).

Die Herkunft der Mutter hatte in unserer Kohorte keinen Einfluss auf das Risiko für eine IVH. In verschiedenen Studien erwies sich die Herkunft dagegen als Einflussfaktor. So gaben Shankaran et al. eine weiße Hautfarbe als protektiven Faktor an (Shankaran et al., 2014). Ment et al. wiesen weißer Hautfarbe ebenfalls eine protektive Komponente zu, allerdings ohne Signifikanz (Ment et al., 2015), während Shankaran et al. in einer älteren Studie von einem erhöhten Risiko für Weiße berichteten (Shankaran et al., 1996).

Während bei einigen Einflussfaktoren in der Literatur Einigkeit über ihre Auswirkung auf die IVH herrscht, ist die Studienlage bei anderen Einflussfaktoren kontrovers. Um ein besseres Verständnis zu erlangen, sind deshalb weitere Studien notwendig.

#### **4.3.4 Einfluss von antenataler Steroidgabe und Apo E Genotyp auf die IVH**

Eine antenatale Steroidgabe erweist sich – wie auch in der vorliegenden Arbeit festgestellt – als protektiv gegenüber Hirnblutungen bei Frühgeborenen. Dieser vorteilhafte Effekt

wurde zunächst in Studien beobachtet, die die Anwendung von Glukokortikoiden zur antenatalen Lungenreifeinduktion untersuchten (Roberts und Morrison, 1991). Der Zusammenhang wurde seitdem in zahlreichen Studien bestätigt (Crowley, 1995; Shankaran et al., 1995; Wright et al., 1995; Blickstein et al., 2006; Wei et al., 2016; Roberts et al., 2017a). Die pathophysiologischen Hintergründe sind jedoch noch nicht vollständig verstanden. Eine mögliche Erklärung könnte eine verbesserte kardiovaskuläre Stabilität unter Glukokortikoiden darstellen, denn die antenatale Steroidgabe ist mit einer geringeren Neigung zu arterieller Hypotonie nach der Geburt assoziiert (Garland et al., 1995; Moise et al., 1995; Padbury et al., 1996). Andere Autoren vermuteten einen verbesserten plazentaren Blutfluss mit in der Folge geringerer Beeinträchtigung der zerebralen Autoregulation (Wallace und Baker, 1999), und auch eine verbesserte mikrostrukturelle Reifung der Kapillaren im Plexus choroideus könnte eine Rolle spielen (Liu et al., 2008).

Wir untersuchten in der vorliegenden Arbeit, ob eine Interaktion zwischen dem Apo E Genotyp und der antenatalen Steroidgabe bei der Reduktion des Hirnblutungs-Risikos besteht und stellten fest, dass auffallend mehr schwere Hirnblutungen bei Frühgeborenen mit Apo E4 auftraten, die keine antenatale Steroidgabe erhielten. Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant. Zudem lag bei Apo E4 die größte ARR bei antenataler Steroidgabe vor. Eine Interaktion von Glukokortikoiden und Apo E untersuchten ebenfalls Trusca et al. Sie stellten fest, dass Glukokortikoide die Apo E Expression in Makrophagen erhöhen und formulierten die Hypothese, dass Glukokortikoide ihre anti-inflammatoryische Wirkung über die Erhöhung von Apo E erreichen (Trusca et al., 2017). Dass Apo E4 von den drei Genotypen auf Grund eines beschleunigten Abbaus die niedrigsten Konzentrationen im Blut aufweist und gleichzeitig weniger anti-inflammatoryisch ist, unterstützt diese Hypothese (Zhang et al., 2010). Ferner könnte deshalb die Wirkung von Glukokortikoiden bei Trägern des Apo E4 Genotyps besonders ausgeprägt sein. Auch bei der Reduktion des IVH-Risikos könnten Glukokortikoide ihre Wirkung über eine Erhöhung von Apo E entfalten. Apo E4 zeigt zahlreiche schädliche Effekte im ZNS und weist dabei auch in den Zellen des ZNS einen schnelleren Abbau auf (Vance und Hayashi, 2010). Träger des Apo E4 Genotyps könnten in Folge dessen möglicherweise stärker von der Wirkung der Glukokortikoide im ZNS profitieren.

Schlussendlich bleibt allerdings offen, ob und inwiefern die Reduktion der IVH durch antenatale Steroidgabe in Abhängigkeit des Apo E Genotyps beeinflusst wird.

## 4.4 Zusammenhang von Sepsis und Apo E Genotyp

In der vorliegenden Arbeit konnten wir keine statistisch signifikanten Unterschiede im Auftreten einer neonatalen Sepsis in Abhängigkeit des Apo E Genotyps nachweisen.

Eine genetische Beeinflussung von Infektionen im Kindesalter berichteten Sørensen et al. hingegen schon 1988. Sie zeigten in ihrer Studie ein sechsfach erhöhtes Risiko an einer Infektion zu sterben für Kinder, deren Eltern vor dem 50. Lebensjahr an einer Infektion verstarben (Sørensen et al., 1988). Eine Vielzahl an Genen wurde seitdem mit Infektionskrankheiten in Verbindung gebracht (Burgner et al., 2006), allerdings gibt es bisher noch keine Studien zum Einfluss von Apo E auf eine Sepsis bei Neugeborenen oder älteren Kindern. Auch bei Erwachsenen gibt es nur wenige Studien zu diesem Zusammenhang. Gale et al. fanden bei Patienten mit schwerer Sepsis zwar vermehrt Gerinnungsstörungen bei Apo E4, konnten jedoch ansonsten keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf das Outcome zwischen den Apo E Genotypen feststellen, sodass sie vermuteten, dass diese den Verlauf einer schweren Sepsis nicht bedeutend beeinflussen (Gale et al., 2014). Hingegen zeigten Moretti et al. an 343 chirurgischen Patienten, dass Träger des Apo E3 Genotyps seltener eine schwere Sepsis entwickelten (Moretti et al., 2005). Drabe et al. stellten außerdem eine erhöhte systemische Inflammation – gemessen an erhöhtem IL 8 und TNF  $\alpha$  – bei Apo E4 Trägern nach kardiopulmonalem Bypass fest (Drabe et al., 2001). Gale et al. fanden des Weiteren eine erhöhte systemische Inflammation bei gesunden Probanden, denen sie intravenös LPS injizierten. Sie berichteten dabei von ausgeprägter Hyperthermie, höheren TNF  $\alpha$ -Spiegeln sowie einem früheren – allerdings nicht signifikanten – Anstieg von IL 6 bei Apo E4. Darüber hinaus wiesen sie nach Stimulation von Blut gesunder Probanden mit Liganden von Toll-Like-Rezeptoren eine erhöhte Sekretion von TNF  $\alpha$  und weiteren proinflammatorischen Zytokinen bei Trägern des Apo E4 Genotyps nach. Sie stellten dabei eine Verbindung zum Cholesterol-Stoffwechsel her, denn unter Apo E4 zeigten sich erhöhte Ansammlungen von Lipidflößen in Monozyten. Dabei handelt es sich um cholesterolreiche Areale von Membranen, die bei Apo E4 auf Grund des weniger effektiven Cholesterol-Effluxes verhindert abgebaut werden. Von diesen Lipidflößen gehen inflammatorische Zellkaskaden aus, die bei ApoE4 in Folge des geringeren Abbaus der Lipidflöße ausgeprägter sind. Demgegenüber vermuteten die Autoren, dass die LPS Neutralisation keinen Ansatz für ein unterschiedliches Verhalten der Apo E Genotypen bei inflammatorischen Prozessen darstellt. Makrophagen, die mit Serum von Trägern des Apo E4 oder Apo E3 Genotyps kultiviert wurden, wurden mit LPS in Kontakt gebracht, dabei konnte jedoch in anschließenden Messungen kein Unterschied der

LPS-Spiegel zwischen den Genotypen festgestellt werden (Gale et al., 2014).

In zahlreichen Versuchen an Mäusen konnte der Apo E4 Genotyp ebenfalls mit einer inflammatorischen Wirkung assoziiert werden. So stellten Gale et al. bei Mäusen, die das humane Apo E4 Gen ins Genom eingesetzt bekamen, nach LPS Injektion stärkere Hypothermie, höhere Sekretionen von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF  $\alpha$  sowie häufiger Leberschäden als bei Mäusen mit Apo E3 fest (Gale et al., 2014). Diese Ergebnisse finden sich ebenfalls bei Lynch et al., die bei Mäusen mit humanem Apo E4 nach LPS-Gabe sowohl im Serum als auch im Gehirn höhere Raten an TNF  $\alpha$  und IL 6 fanden (Lynch et al., 2003). Insgesamt bestätigten zahlreiche Studien den Zusammenhang des Apo E4 Genotyps mit erhöhten proinflammatorischen Zytokinspiegeln (Maezawa et al., 2006; Tsoi et al., 2007). Darüber hinaus zeigen Mäuse mit Apo E4 eine erhöhte Mortalität im Rahmen inflammatorischer Prozesse, die von Wang et al. durch eine Ligatur und Punktions des Zökums provoziert wurden (Wang et al., 2009). Apo E4 zeigt geringere Plasma-Spiegel als die anderen beiden Genotypen und Zhang et al. stellten die Hypothese auf, dass die geringeren Konzentrationen die reduzierte anti-inflammatorische Komponente von Apo E4 erklären könnten (Zhang et al., 2010). Leung und Harris vermuteten, dass die stärkere Bindung von Apo E4 an den LDL-Rezeptor zu einer verstärkten Antigenpräsentation führen und darüber zur schädlichen Wirkung von Apo E4 beitragen könnte (Leung und Harris, 2011). Apo E bindet dabei physiologischerweise Antigene und führt mittels LDL-Rezeptor zu einer Aufnahme in dendritische Zellen und B-Zellen mit anschließender Präsentation der Antigene an natürliche Killer-T-Zellen (van den Elzen et al., 2005; Allan et al., 2009).

Obwohl in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Einfluss des Apo E Genotyps auf die Entwicklung einer neonatalen Sepsis nachgewiesen werden konnte, gibt es in der Literatur zahlreiche Hinweise auf eine Assoziation des Apo E4 Genotyps mit verstärkter Inflammation. Ob dieser Zusammenhang Bestand hat und ob ein Einfluss des Apo E Genotyps auf inflammatorische Prozesse Neugeborener oder Kinder besteht, muss in künftigen Studien überprüft werden. Langfristig bietet die Kenntnis genetischer Einflussfaktoren die Möglichkeit der Entwicklung einer gezielten Therapie. So konnte ein von Apo E abgeleitetes Peptid im Mausmodell bereits erhöhte TNF  $\alpha$ - und IL 6-Spiegel im Serum und im Gehirn von Apo E4 Mäusen rückgängig machen (Lynch et al., 2003). Wang et al. demonstrierten ebenfalls, dass ein von Apo E abgeleitetes Peptid die erhöhte Mortalität unter Apo E4 im Rahmen inflammatorischer Prozesse reduziert (Wang et al., 2009). Pane et al. untersuchten die Wirkung eines von Apo E abgeleiteten Peptides auf Bakterienkulturen und stellten fest, dass es sowohl gram-positive Zellen wie *Staphylococcus aureus* als auch

gram-negative Zellen wie *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* oder *Pseudomonas aeruginosa* tötete, während es gegenüber Zellkulturen von humanen Hepatozyten keine Toxizität zeigte (Pane et al., 2016).

## 4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Apo E ist der wichtigste genetische Risikofaktor intrazerebraler Blutungen Erwachsener. Wir konnten diesen Risikofaktor in einer Multicenterstudie an einer großen Kohorte Frühgeborener mit einem erhöhten Risiko für IVHs assoziieren. Insbesondere schwere IVHs traten dabei gehäuft auf. Zudem zeigte sich für Träger des Apo E2 Genotyps ein erhöhtes Risiko, eine PVL zu entwickeln. Weitere Studien an großen Populationen sind nötig, um unsere Ergebnisse zu überprüfen. Außerdem stellt auch das langfristige Outcome nach IVH einen interessanten Untersuchungsaspekt zukünftiger Studien dar, da Studien bei Erwachsenen ein schlechteres langfristiges Outcome bei Apo E2 und Apo E4 ergaben (Biffi et al., 2011; Brouwers et al., 2012; Biffi et al., 2016).

In der vorliegenden Arbeit bestätigten wir das männliche Geschlecht, ein niedriges GA, einen niedrigen Apgar, eine tracheale Beatmung, einen Pneumothorax und einen Mehrlingsstatus als Risikofaktoren für eine schwere IVH, während eine antenatale Steroidgabe sowie eine Geburt als SGA sich als protektive Faktoren zeigten.

Auf Grundlage dieser genetischen Einflussfaktoren und Umweltfaktoren können Risikogruppen identifiziert werden. Das ist für die IVH von besonderem Interesse, da sie zu 90 % innerhalb der ersten drei Lebenstage und damit in einem sehr engen Zeitfenster auftritt (Szpecht et al., 2016). Gefährdete Neugeborene könnten besonders aufmerksam beobachtet werden, wobei beispielsweise eine engere Überwachung des Blutdruckes und der Gerinnung vorstellbar wäre. Dies erscheint realisierbar, da Frühgeborene nach der Geburt regelhaft intensivmedizinisch betreut werden.

Der Apo E Genotyp hatte in unserer Kohorte keinen Einfluss auf das Auftreten einer neonatalen Sepsis. Da es sich bei der vorliegenden Untersuchung jedoch um die erste handelt, die eine Auswirkung des Apo E Genotyps auf die Entwicklung einer neonatalen Sepsis erforschte, sind weitere Studien nötig, um diesen Zusammenhang zu untersuchen. Zudem spielen inflammatorische Prozesse auch in anderen Erkrankungen eine Rolle. Dies könnte bei der zukünftigen Untersuchung der Hintergründe neonatologischer Krankheiten berücksichtigt werden und zu einem besseren Verständnis dieser Erkrankungen beitragen.

Eine Erforschung genetischer Komponenten von Erkrankungen kann Grundlage von präventiven oder therapeutischen Interventionen sein. Es gibt dabei sowohl für Hirnblutungen als auch zur Eindämmung inflammatorischer Prozesse bereits therapeutische Ansätze auf Basis von Apo E (Lynch et al., 2003; Wang et al., 2009; Pane et al., 2016; Wu et al., 2016; Guptill et al., 2017).

## 5 Zusammenfassung

Frühgeborene tragen ein besonders hohes Risiko für die Entwicklung intraventrikulärer Hämorrhagien. Polymorphismen im Apolipoprotein E Gen sind die wichtigsten genetischen Risikofaktoren für intrazerebrale Blutungen Erwachsener, bei Kindern gibt es hingegen noch keine Studien zum Einfluss von Apolipoprotein E auf Hirnblutungen. Allerdings zeigen die Apolipoprotein E2 und Apolipoprotein E4 Genotypen schädliche Effekte auf die Entwicklung und den Verlauf zentralnervöser Erkrankungen des Kindes. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Apolipoprotein E auf die Entwicklung intraventrikulärer Hämorrhagien sowie den Effekt weiterer Einflussfaktoren zu untersuchen. Zudem überprüften wir die Auswirkung von Apolipoprotein E auf die Prävalenz einer neonatalen Sepsis, da Studien eine verstärkte Inflammation bei Apolipoprotein E4 zeigen.

Dafür wurden von Januar 2009 bis Dezember 2014 7 952 Frühgeborene mit einem Gestationsalter < 32 Schwangerschaftswochen und einem Geburtsgewicht < 1 500 g aus den Kliniken des deutschen Frühgeborenen-Netzwerkes eingeschlossen. Mittels standardisierter Fragebögen wurde der klinische Verlauf erfasst. Zudem wurde aus Nabelschnurproben und Mundschleimhautabstrichen kindliche DNA isoliert und in der PCR auf den Apolipoprotein E Genotyp untersucht. Mit Hilfe einer logistischen Regression wurden des Weiteren die Einflussfaktoren der intraventrikulären Hämorrhagie in unserer Kohorte ermittelt.

Frühgeborene mit Apolipoprotein E2 Genotyp wurden signifikant seltener als small for gestational age geboren. Wir konnten zudem Apolipoprotein E2 und Apolipoprotein E4 als Risikofaktoren für das Auftreten und für einen schweren Verlauf intraventrikulärer Hämorrhagien nachweisen. Es zeigte sich dabei ein dosisabhängiger Effekt zwischen der Anzahl der Apolipoprotein E Allele und dem Risiko für eine intraventrikuläre Hämorrhagie. Darüber hinaus war Apolipoprotein E2 mit dem häufigeren Auftreten einer periventrikulären Leukomalazie assoziiert. Wir bestätigten in unserer Kohorte das männliche Geschlecht, ein niedriges GA, einen niedrigen Apgar, eine tracheale Beatmung, einen Pneumothorax und einen Mehrlingsstatus als Risikofaktoren für intraventrikuläre Hämorrhagien. Eine antenatale Steroidgabe und eine Geburt als small for gestational age konnten wir dagegen als protektive Faktoren nachweisen. Ein Einfluss des Apo E Genotyps auf die Entwicklung einer neonatalen Sepsis konnte nicht festgestellt werden.

Unsere Ergebnisse müssen in zukünftigen Studien noch bestätigt werden, könnten jedoch langfristig eine bessere klinische Versorgung und neue Therapiemöglichkeiten ergeben.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aarnoudse-Moens CSH, Weisglas-Kuperus N, van Goudoever JB, Oosterlaan J (2009): Meta-analysis of neurobehavioral outcomes in very preterm and/or very low birth weight children. *Pediatrics* 124, 717–728
- Ådén U, Lin A, Carlo W, Leviton A, Murray JC, Hallman M, Lifton RP, Zhang H, Ment LR (2013): Candidate gene analysis: Severe intraventricular hemorrhage in inborn preterm neonates. *J Pediatr* 163, 1503–1506.e1
- Akisu M, Balim Z, Cetin H, Kosova B, Yalaz M, Topcuoglu N, Kultursay N (2004): The role of angiotensin-converting enzyme and apolipoprotein-E gene polymorphisms on lipid compositions in newborn infants with intrauterine growth restriction. *Early Hum Dev* 78, 95–103
- Ali K, Middleton M, Puré E, Rader DJ (2005): Apolipoprotein E suppresses the type I inflammatory response in vivo. *Circ Res* 97, 922–927
- Allan LL, Hoefl K, Zheng D-J, Chung BK, Kozak FK, Tan R, van den Elzen P (2009): Apolipoprotein-mediated lipid antigen presentation in B cells provides a pathway for innate help by NKT cells. *Blood* 114, 2411–2416
- Allen KA (2013): Treatment of intraventricular hemorrhages in premature infants: where is the evidence? *Adv Neonatal Care Off J Natl Assoc Neonatal Nurses* 13, 127–130
- Ancel P-Y, Livinec F, Larroque B, Marret S, Arnaud C, Pierrat V, Dehan M, N'Guyen S, Escande B, Burguet A, Thiriez G, Picaud J-C, André M, Bréart G, Kaminski M, EPIPAGE Study Group (2006): Cerebral palsy among very preterm children in relation to gestational age and neonatal ultrasound abnormalities: the EPIPAGE cohort study. *Pediatrics* 117, 828–835
- Baitsch D, Bock HH, Engel T, Telgmann R, Müller-Tidow C, Varga G, Bot M, Herz J, Robenek H, von Eckardstein A, Nofer J-R (2011): Apolipoprotein E induces antiinflammatory phenotype in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 1160–1168
- Becher J-C, Bell JE, McIntosh N, Keeling JW (2005): Distribution of apolipoprotein E alleles in a Scottish healthy newborn population. *Biol Neonate* 88, 164–167

- Bhan C, Dipankar P, Chakraborty P, Sarangi PP (2016): Role of cellular events in the pathophysiology of sepsis. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc A1* 65, 853–868
- Bhandari V, Bizzarro MJ, Shetty A, Zhong X, Page GP, Zhang H, Ment LR, Gruen JR, Neonatal Genetics Study Group (2006): Familial and genetic susceptibility to major neonatal morbidities in preterm twins. *Pediatrics* 117, 1901–1906
- Biffi A, Sonni A, Anderson CD, Kissela B, Jagiella JM, Schmidt H, Jimenez-Conde J, Hansen BM, Fernandez-Cadenas I, Cortellini L, Ayres A, Schwab K, Juchniewicz K, Urbanik A, Rost NS, Viswanathan A, Seifert-Held T, Stoegerer E-M, Tomás M, Rabionet R, Estivill X, Brown DL, Silliman SL, Selim M, Worrall BB, Meschia JF, Montaner J, Lindgren A, Roquer J, Schmidt R, Greenberg SM, Slowik A, Broderick JP, Woo D, Rosand J, International Stroke Genetics Consortium (2010): Variants at APOE influence risk of deep and lobar intracerebral hemorrhage. *Ann Neurol* 68, 934–943
- Biffi A, Anderson CD, Jagiella JM, Schmidt H, Kissela B, Hansen BM, Jimenez-Conde J, Pires CR, Ayres AM, Schwab K, Cortellini L, Pera J, Urbanik A, Romero JM, Rost NS, Goldstein JN, Viswanathan A, Pichler A, Enzinger C, Rabionet R, Norrvig B, Tirschwell DL, Selim M, Brown DL, Silliman SL, Worrall BB, Meschia JF, Kidwell CS, Broderick JP, Greenberg SM, Roquer J, Lindgren A, Slowik A, Schmidt R, Woo D, Rosand J (2011): APOE Genotype Predicts Extent of Bleeding and Outcome in Lobar Intracerebral Hemorrhage. *Lancet Neurol* 10, 702–709
- Biffi A, Bailey D, Anderson CD, Ayres AM, Gurol EM, Greenberg SM, Rosand J, Viswanathan A (2016): Risk Factors Associated With Early vs Delayed Dementia After Intracerebral Hemorrhage. *JAMA Neurol* 73, 969–976
- Blackman JA, Worley G, Strittmatter WJ (2005): Apolipoprotein E and brain injury: implications for children. *Dev Med Child Neurol* 47, 64–70
- Blackman JA, Gurka MJ, Bao Y, Dragulev BP, Chen W-M, Romness MJ (2009): Apolipoprotein E and functional motor severity in cerebral palsy. *J Pediatr Rehabil Med* 2, 67–74
- Blackman JA, Gordish-Dressman H, Bao Y, Matsumoto JA, Sinkin RA (2014): The Apolipoprotein gene and recovery from brain injury among extremely preterm infants. *Neonatology* 105, 227–229

- Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller A-B, 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 Lond Engl* 379, 2162–2172
- Blickstein I, Reichman B, Lusky A, Shinwell ES, Israel Neonatal Network (2006): Plurality-dependent risk of severe intraventricular hemorrhage among very low birth weight infants and antepartum corticosteroid treatment. *Am J Obstet Gynecol* 194, 1329–1333
- Braga LW, Borigato EVM, Speck-Martins CE, Imamura EU, Gorges AMP, Izumi AP, Dantas RC, Nunes LGN (2009): Apolipoprotein E genotype and cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol* 52, 666–671
- Brichtová E, Kozák L (2008): Apolipoprotein E genotype and traumatic brain injury in children--association with neurological outcome. *Childs Nerv Syst ChNS Off J Int Soc Pediatr Neurosurg* 24, 349–356
- Broer L, Buchman AS, Deelen J, Evans DS, Faul JD, Lunetta KL, Sebastiani P, Smith JA, Smith AV, Tanaka T, Yu L, Arnold AM, Aspelund T, Benjamin EJ, De Jager PL, Eirkisdottir G, Evans DA, Garcia ME, Hofman A, Kaplan RC, Kardia SLR, Kiel DP, Oostra BA, Orwoll ES, Parimi N, Psaty BM, Rivadeneira F, Rotter JI, Seshadri S, Singleton A, Tiemeier H, Uitterlinden AG, Zhao W, Bandinelli S, Bennett DA, Ferrucci L, Gudnason V, Harris TB, Karasik D, Launer LJ, Perls TT, Slagboom PE, Tranah GJ, Weir DR, Newman AB, van Duijn CM, Murabito JM (2015): GWAS of Longevity in CHARGE Consortium Confirms APOE and FOXO3 Candidacy. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 70, 110–118
- Brouwers HB, Biffi A, Ayres AM, Schwab K, Cortellini L, Romero JM, Rost NS, Viswanathan A, Greenberg SM, Rosand J, Goldstein JN (2012): Apolipoprotein E genotype predicts hematoma expansion in lobar intracerebral hemorrhage. *Stroke* 43, 1490–1495
- Burgner D, Jamieson SE, Blackwell JM (2006): Genetic susceptibility to infectious diseases: big is beautiful, but will bigger be even better? *Lancet Infect Dis* 6, 653–663

- Burt TD, Agan BK, Marconi VC, He W, Kulkarni H, Mold JE, Cavrois M, Huang Y, Mahley RW, Dolan MJ, McCune JM, Ahuja SK (2008): Apolipoprotein (apo) E4 enhances HIV-1 cell entry in vitro, and the APOE epsilon4/epsilon4 genotype accelerates HIV disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 8718–8723
- Carpenter AM, Singh IP, Gandhi CD, Prestigiacomo CJ (2016): Genetic risk factors for spontaneous intracerebral haemorrhage. *Nat Rev Neurol* 12, 40–49
- Catto AJ, McCormack LJ, Mansfield MW, Carter AM, Bamford JM, Robinson P, Grant PJ (2000): Apolipoprotein E polymorphism in cerebrovascular disease. *Acta Neurol Scand* 101, 399–404
- Chen C, Hu Z (2016): ApoE Polymorphisms and the Risk of Different Subtypes of Stroke in the Chinese Population: A Comprehensive Meta-Analysis. *Cerebrovasc Dis Basel Switz* 41, 119–138
- Chowdhury AH, Yokoyama T, Kokubo Y, Zaman MM, Haque A, Tanaka H (2001): Apolipoprotein E genetic polymorphism and stroke subtypes in a Bangladeshi hospital-based study. *J Epidemiol* 11, 131–138
- Christian EA, Jin DL, Attenello F, Wen T, Cen S, Mack WJ, Krieger MD, McComb JG (2015): Trends in hospitalization of preterm infants with intraventricular hemorrhage and hydrocephalus in the United States, 2000–2010. *J Neurosurg Pediatr* 17, 260–269
- Corbo RM, Scacchi R (1999): Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE\*4 a „thrifty“ allele? *Ann Hum Genet* 63, 301–310
- Crowley PA (1995): Antenatal corticosteroid therapy: a meta-analysis of the randomized trials, 1972 to 1994. *Am J Obstet Gynecol* 173, 322–335
- Cuestas E, Bas J, Pautasso J (2009): Sex differences in intraventricular hemorrhage rates among very low birth weight newborns. *Gend Med* 6, 376–382
- Dean DC, Jerskey BA, Chen K, Protas H, Thiyyagura P, Roontiva A, O’Muircheartaigh J, Dirks H, Waskiewicz N, Lehman K, Siniard AL, Turk MN, Hua X, Madsen SK, Thompson PM, Fleisher AS, Huentelman MJ, Deoni SCL, Reiman EM (2014): Brain Differences in Infants at Differential Genetic Risk for Late-Onset Alzheimer Disease A Cross-sectional Imaging Study. *JAMA Neurol* 71, 11–22

- de Bont N, Netea MG, Demacker PN, Kullberg BJ, van der Meer JW, Stalenhoef AF (2000): Apolipoprotein E-deficient mice have an impaired immune response to Klebsiella pneumoniae. *Eur J Clin Invest* 30, 818–822
- de Kieviet JF, Zoetebier L, van Elburg RM, Vermeulen RJ, Oosterlaan J (2012): Brain development of very preterm and very low-birthweight children in childhood and adolescence: a meta-analysis. *Dev Med Child Neurol* 54, 313–323
- Deelen J, Evans DS, Arking DE, Tesi N, Nygaard M, Liu X, Wojczynski MK, Biggs ML, Spek A van der, Atzmon G, Ware EB, Sarnowski C, Smith AV, Seppälä I, Cordell HJ, Dose J, Amin N, Arnold AM, Ayers KL, Barzilai N, Becker EJ, Beekman M, Blanché H, Christensen K, Christiansen L, Collerton JC, Cubaynes S, Cummings SR, Davies K, Debrabant B, Deleuze J-F, Duncan R, Faul JD, Franceschi C, Galan P, Gudnason V, Harris TB, Huisman M, Hurme MA, Jagger C, Jansen I, Jylhä M, Kähönen M, Karasik D, Kardia SLR, Kingston A, Kirkwood TBL, Launer LJ, Lehtimäki T, Lieb W, Lyytikäinen L-P, Martin-Ruiz C, Min J, Nebel A, Newman AB, Nie C, Nohr EA, Orwoll ES, Perls TT, Province MA, Psaty BM, Raitakari OT, Reinders MJT, Robine J-M, Rotter JI, Sebastiani P, Smith J, Sørensen TIA, Taylor KD, Uitterlinden AG, Flier W van der, Lee SJ van der, Duijn CM van, Heemst D van, Vaupel JW, Weir D, Ye K, Zeng Y, Zheng W, Holstege H, Kiel DP, Lunetta KL, Slagboom PE, Murabito JM (2019): A meta-analysis of genome-wide association studies identifies multiple longevity genes. *Nat Commun* 10, 1–14
- Descamps OS, Bruniaux M, Guilmot P-F, Tonglet R, Heller FR (2004): Lipoprotein concentrations in newborns are associated with allelic variations in their mothers. *Atherosclerosis* 172, 287–298
- Devan WJ, Falcone GJ, Anderson CD, Jagiella JM, Schmidt H, Hansen BM, Jimenez-Conde J, Giralt-Steinhauer E, Cuadrado-Godia E, Soriano C, Ayres AM, Schwab K, Kassis SB, Valant V, Pera J, Urbanik A, Viswanathan A, Rost NS, Goldstein JN, Freudenberg P, Stögerer E-M, Norrvig B, Tirschwell DL, Selim M, Brown DL, Silliman SL, Worrall BB, Meschia JF, Kidwell CS, Montaner J, Fernandez-Cadenas I, Delgado P, Greenberg SM, Roquer J, Lindgren A, Slowik A, Schmidt R, Woo D, Rosand J, Biffi A, International Stroke Genetics Consortium (2013): Heritability estimates identify a substantial genetic contribution to risk and outcome of intracerebral hemorrhage. *Stroke* 44, 1578–1583

- Didier C, Streicher M-P, Chognot D, Campagni R, Schnebelen A, Messer J, Donato L, Langer B, Meyer N, Astruc D, Kuhn P (2012): Late-onset neonatal infections: incidences and pathogens in the era of antenatal antibiotics. *Eur J Pediatr* 171, 681–687
- Dobson CB, Sales SD, Hoggard P, Wozniak MA, Crutcher KA (2006): The receptor-binding region of human apolipoprotein E has direct anti-infective activity. *J Infect Dis* 193, 442–450
- Dong Y, Speer CP (2015): Late-onset neonatal sepsis: recent developments. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 100, F257–F263
- Drabe N, Zünd G, Grünenfelder J, Sprenger M, Hoerstrup SP, Bestmann L, Maly FE, Turina M (2001): Genetic predisposition in patients undergoing cardiopulmonary bypass surgery is associated with an increase of inflammatory cytokines. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg* 20, 609–613
- Duzenli S, Pirim I, Gepdiremen A, Deniz O (2004): Apolipoprotein E polymorphism and stroke in a population from eastern Turkey. *J Neurogenet* 18, 365–375
- Edwards SL, Beesley J, French JD, Dunning AM (2013): Beyond GWASs: Illuminating the Dark Road from Association to Function. *Am J Hum Genet* 93, 779–797
- Eichner JE, Dunn ST, Perveen G, Thompson DM, Stewart KE, Stroehla BC (2002): Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 155, 487–495
- Eisenberg DTA, Kuzawa CW, Hayes MG (2010): Worldwide allele frequencies of the human apolipoprotein E gene: climate, local adaptations, and evolutionary history. *Am J Phys Anthropol* 143, 100–111
- Falcone GJ, Radmanesh F, Brouwers HB, Battey TWK, Devan WJ, Valant V, Raffeld MR, Chitsike LP, Ayres AM, Schwab K, Goldstein JN, Viswanathan A, Greenberg SM, Selim M, Meschia JF, Brown DL, Worrall BB, Silliman SL, Tirschwell DL, Flaherty ML, Martini SR, Deka R, Biffi A, Kraft P, Woo D, Rosand J, Anderson CD (2014): APOE ε variants increase risk of warfarin-related intracerebral hemorrhage. *Neurology* 83, 1139–1146

- Gale SC, Gao L, Mikacenic C, Coyle SM, Rafaels N, Murray Dudenkov T, Madenspacher JH, Draper DW, Ge W, Aloor JJ, Azzam KM, Lai L, Blackshear PJ, Calvano SE, Barnes KC, Lowry SF, Corbett S, Wurfel MM, Fessler MB (2014): APOε4 is associated with enhanced in vivo innate immune responses in human subjects. *J Allergy Clin Immunol* 134, 127–134
- Galli KK, Zimmerman RA, Jarvik GP, Wernovsky G, Kuypers MK, Clancy RR, Montenegro LM, Mahle WT, Newman MF, Saunders AM, Nicolson SC, Spray TL, Gaynor JW (2004): Periventricular leukomalacia is common after neonatal cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 127, 692–704
- Garatachea N, Emanuele E, Calero M, Fuku N, Arai Y, Abe Y, Murakami H, Miyachi M, Yvert T, Verde Z, Zea MA, Venturini L, Santiago C, Santos-Lozano A, Rodríguez-Romo G, Ricevuti G, Hirose N, Rábano A, Lucia A (2014): ApoE gene and exceptional longevity: Insights from three independent cohorts. *Exp Gerontol* 53, 16–23
- Garatachea N, Marín PJ, Santos-Lozano A, Sanchis-Gomar F, Emanuele E, Lucia A (2015): The ApoE gene is related with exceptional longevity: a systematic review and meta-analysis. *Rejuvenation Res* 18, 3–13
- Garland JS, Buck R, Leviton A (1995): Effect of maternal glucocorticoid exposure on risk of severe intraventricular hemorrhage in surfactant-treated preterm infants. *J Pediatr* 126, 272–279
- Gaynor JW, Gerdes M, Zackai EH, Bernbaum J, Wernovsky G, Clancy RR, Newman MF, Saunders AM, Heagerty PJ, D'Agostino JA, McDonald-McGinn D, Nicolson SC, Spray TL, Jarvik GP (2003): Apolipoprotein E genotype and neurodevelopmental sequelae of infant cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 126, 1736–1745
- Gaynor JW, Kim DS, Arrington CB, Atz AM, Bellinger DC, Burt AA, Ghanayem NS, Jacobs JP, Lee TM, Lewis AB, Mahle WT, Marino BS, Miller SG, Newburger JW, Pizarro C, Ravishankar C, Santani AB, Wilder NS, Jarvik GP, Mital S, Russell MW (2014): Validation of association of the apolipoprotein E ε2 allele with neurodevelopmental dysfunction after cardiac surgery in neonates and infants. *J Thorac Cardiovasc Surg* 148, 2560–2566
- Giau VV, Bagyinszky E, An SSA, Kim SY (2015): Role of apolipoprotein E in neurodegenerative diseases. *Neuropsychiatr Dis Treat* 11, 1723–1737

- Godin O, Tzourio C, Maillard P, Alpérovitch A, Mazoyer B, Dufouil C (2009): Apolipoprotein E genotype is related to progression of white matter lesion load. *Stroke* 40, 3186–3190
- Gondo Y, Hirose N, Arai Y, Inagaki H, Masui Y, Yamamura K, Shimizu K, Takayama M, Ebihara Y, Nakazawa S, Kitagawa K (2006): Functional status of centenarians in Tokyo, Japan: developing better phenotypes of exceptional longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61, 305–310
- Grimm D, Blum HE, Thimme R (2011): Genomweite Assoziationsstudien. *DMW - Dtsch Med Wochenschr* 136, 95–98
- Guptill JT, Raja SM, Boakye-Agyeman F, Noveck R, Ramey S, Tu TM, Laskowitz DT (2017): Phase 1 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study to Determine the Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of a Single Escalating Dose and Repeated Doses of CN-105 in Healthy Adult Subjects. *J Clin Pharmacol* 57, 770–776
- Han X (2004): The role of apolipoprotein E in lipid metabolism in the central nervous system. *Cell Mol Life Sci CMSL* 61, 1896–1906
- Handley SC, Passarella M, Lee HC, Lorch SA (2018): Incidence Trends and Risk Factor Variation in Severe Intraventricular Hemorrhage across a Population Based Cohort. *J Pediatr* 24-29.e3
- Hauser PS, Narayanaswami V, Ryan RO (2011): Apolipoprotein E: from lipid transport to neurobiology. *Prog Lipid Res* 50, 62–74
- Heeren J, Beisiegel U, Grewal T (2006): Apolipoprotein E recycling: implications for dyslipidemia and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 442–448
- Heuchan AM, Evans N, Henderson Smart DJ, Simpson JM (2002): Perinatal risk factors for major intraventricular haemorrhage in the Australian and New Zealand Neonatal Network, 1995-97. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 86, F86-90
- Holtzman DM, Herz J, Bu G (2012): Apolipoprotein E and Apolipoprotein E Receptors: Normal Biology and Roles in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006312
- Howson CP, Kinney MV, McDougall L, Lawn JE (2013): Born Toon Soon: Preterm birth matters. *Reprod Health* 10, S1

- Hüppi PS, Warfield S, Kikinis R, Barnes PD, Zientara GP, Jolesz FA, Tsuji MK, Volpe JJ (1998): Quantitative magnetic resonance imaging of brain development in premature and mature newborns. *Ann Neurol* 43, 224–235
- Ihle A, Bunce D, Kliegel M (2012): APOE ε4 and cognitive function in early life: a meta-analysis. *Neuropsychology* 26, 267–277
- Inder TE, Perlman JM, Volpe JJ (2018): Chapter 24 - Preterm Intraventricular Hemorrhage/Posthemorrhagic Hydrocephalus. In: Volpe JJ, Inder TE, Darras BT, de Vries LS, du Plessis AJ, Neil JJ, Perlman JM (Hrsg.): *Volpe's Neurology of the Newborn*. 6. Aufl., 637-698, Elsevier, Philadelphia
- Infante-Rivard C, Levy E, Rivard G, Guiguet M, Feoli-Fonseca J (2003): Small babies receive the cardiovascular protective apolipoprotein ε2 allele less frequently than expected. *J Med Genet* 40, 626–629
- Johnson S, Marlow N (2017): Early and long-term outcome of infants born extremely preterm. *Arch Dis Child* 102, 97–102
- Kassam I, Gagnon F, Cusimano MD (2016): Association of the APOE-ε4 allele with outcome of traumatic brain injury in children and youth: a meta-analysis and meta-regression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 87, 433–440
- Kern S, Mehlig K, Kern J, Zetterberg H, Thelle D, Skoog I, Lissner L, Blennow K, Börjesson-Hanson A (2015): The distribution of apolipoprotein E genotype over the adult lifespan and in relation to country of birth. *Am J Epidemiol* 181, 214–217
- Koch W, Ehrenhaft A, Griesser K, Pfeufer A, Müller J, Schömig A, Kastrati A (2002): TaqMan systems for genotyping of disease-related polymorphisms present in the gene encoding apolipoprotein E. *Clin Chem Lab Med* 40, 1123–1131
- Kockx M, Traini M, Kritharides L (2018): Cell-specific production, secretion, and function of apolipoprotein E. *J Mol Med Berl Ger* 96, 361–371
- Kokubo Y, Chowdhury AH, Date C, Yokoyama T, Sobue H, Tanaka H (2000): Age-dependent association of apolipoprotein E genotypes with stroke subtypes in a Japanese rural population. *Stroke* 31, 1299–1306
- Korja M, Ylijoki M, Lapinleimu H, Pohjola P, Matomäki J, Kuśmierk H, Mahlman M, Rikalainen H, Parkkola R, Kaukola T, Lehtonen L, Hallman M, Haataja L (2013): Apolipoprotein E, brain injury and neurodevelopmental outcome of children. *Genes Brain Behav* 12, 348–352

- Kuroda MM, Weck ME, Sarwark JF, Hamidullah A, Wainwright MS (2007): Association of apolipoprotein E genotype and cerebral palsy in children. *Pediatrics* 119, 306–313
- Kurowski B, Martin LJ, Wade SL (2012): Genetics and outcomes after traumatic brain injury (TBI): What do we know about pediatric TBI? *J Pediatr Rehabil Med* 5, 217–231
- Lavenex P, Lavenex PB, Cachat F, Gehri M, Juvet T (2016): No association between ApoE polymorphism and febrile seizures. *Neurol Sci Off J Ital Neurol Soc Ital Soc Clin Neurophysiol* 37, 31–36
- Lemmens R, Görner A, Schrooten M, Thijs V (2007): Association of apolipoprotein E epsilon2 with white matter disease but not with microbleeds. *Stroke* 38, 1185–1188
- Leung B, Harris HW (2011): NKT cells: the culprits of sepsis? *J Surg Res* 167, 87–95
- Lewis AJ, Billiar TR, Rosengart MR (2016): Biology and Metabolism of Sepsis: Innate Immunity, Bioenergetics, and Autophagy. *Surg Infect* 17, 286–293
- Lien E, Andersen GL, Bao Y, Gordish-Dressman H, Skranes JS, Vik T, Blackman JA (2013): Apolipoprotein E polymorphisms and severity of cerebral palsy: a cross-sectional study in 255 children in Norway. *Dev Med Child Neurol* 55, 372–377
- Lien E, Andersen G, Bao Y, Gordish-Dressman H, Skranes JS, Blackman JA, Vik T (2015): Genes determining the severity of cerebral palsy: the role of single nucleotide polymorphisms on the amount and structure of apolipoprotein E. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992 104, 701–706
- Liu J, Feng Z-C, Yin X-J, Chen H, Lu J, Qiao X (2008): The role of antenatal corticosteroids for improving the maturation of choroid plexus capillaries in fetal mice. *Eur J Pediatr* 167, 1209–1212
- Liu L, Oza S, Hogan D, Chu Y, Perin J, Zhu J, Lawn JE, Cousens S, Mathers C, Black RE (2016): Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000-15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet Lond Engl* 388, 3027–3035
- Lo TYM, Jones PA, Chambers IR, Beattie TF, Forsyth R, Mendelow AD, Minns RA (2009): Modulating effect of apolipoprotein E polymorphisms on secondary brain insult and outcome after childhood brain trauma. *Childs Nerv Syst ChNS Off J Int Soc Pediatr Neurosurg* 25, 47–54

- Lynch JR, Tang W, Wang H, Vitek MP, Bennett ER, Sullivan PM, Warner DS, Laskowitz DT (2003): APOE Genotype and an ApoE-mimetic Peptide Modify the Systemic and Central Nervous System Inflammatory Response. *J Biol Chem* 278, 48529–48533
- Maezawa I, Nivison M, Montine KS, Maeda N, Montine TJ (2006): Neurotoxicity from innate immune response is greatest with targeted replacement of E4 allele of apolipoprotein E gene and is mediated by microglial p38MAPK. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 20, 797–799
- Mahley RW, Huang Y (2012): Apolipoprotein E Sets the Stage: Response to Injury Triggers Neuropathology, Including Alzheimer's Disease. *Neuron* 76, 871–885
- Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y (2006): Apolipoprotein E4: A causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5644–5651
- Martínez-González NA, Sudlow CLM (2006): Effects of apolipoprotein E genotype on outcome after ischaemic stroke, intracerebral haemorrhage and subarachnoid haemorrhage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77, 1329–1335
- McCarron MO, Hoffmann KL, DeLong DM, Gray L, Saunders AM, Alberts MJ (1999): Intracerebral hemorrhage outcome: apolipoprotein E genotype, hematoma, and edema volumes. *Neurology* 53, 2176–2179
- McCarron MO, Weir CJ, Muir KW, Hoffmann KL, Graffagnino C, Nicoll J a. R, Lees KR, Alberts MJ (2003): Effect of apolipoprotein E genotype on in-hospital mortality following intracerebral haemorrhage. *Acta Neurol Scand* 107, 106–109
- McCrea HJ, Ment LR (2008): The Diagnosis, Management and Postnatal Prevention of Intraventricular Hemorrhage in the Preterm Neonate. *Clin Perinatol* 35, 777–792, vii
- McMichael GL, Gibson CS, Goldwater PN, Haan EA, Priest K, Dekker GA, MacLennan AH, South Australian Cerebral Palsy Research Group (2008): Association between Apolipoprotein E genotype and cerebral palsy is not confirmed in a Caucasian population. *Hum Genet* 124, 411–416
- Ment LR, Ådén U, Bauer CR, Bada HS, Carlo WA, Kaiser JR, Lin A, Cotten CM, Murray J, Page G, Hallman M, Lifton RP, Zhang H (2015): Genes and Environment in Neonatal Intraventricular Hemorrhage. *Semin Perinatol* 39, 592–603
- Milligan DW (1980): Failure of autoregulation and intraventricular haemorrhage in preterm infants. *Lancet Lond Engl* 1, 896–898

- Mohamed MA, Aly H (2010): Male gender is associated with intraventricular hemorrhage. *Pediatrics* 125, e333-339
- Moïse AA, Wearden ME, Kozinetz CA, Gest AL, Welty SE, Hansen TN (1995): Antenatal steroids are associated with less need for blood pressure support in extremely premature infants. *Pediatrics* 95, 845–850
- Moran LM, Taylor HG, Ganesalingam K, Gastier-Foster JM, Frick J, Bangert B, Dietrich A, Nuss KE, Rusin J, Wright M, Yeates KO (2009): Apolipoprotein E4 as a predictor of outcomes in pediatric mild traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 26, 1489–1495
- Moretti EW, Morris RW, Podgoreanu M, Schwinn DA, Newman MF, Bennett E, Moulin VG, Mba UU, Laskowitz DT, Perioperative Genetics and Safety Outcomes Study (PEGASUS) Investigative Team (2005): APOE polymorphism is associated with risk of severe sepsis in surgical patients. *Crit Care Med* 33, 2521–2526
- Mukerji A, Shah V, Shah PS (2015): Periventricular/Intraventricular Hemorrhage and Neurodevelopmental Outcomes: A Meta-analysis. *Pediatrics* 136, 1132–1143
- Murphy DJ (2007): Epidemiology and environmental factors in preterm labour. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 21, 773–789
- Murphy SL, Mathews TJ, Martin JA, Minkovitz CS, Strobino DM (2017): Annual Summary of Vital Statistics: 2013-2014. *Pediatrics* 139, e20163239
- Namath A, Patterson AJ (2009): Genetic polymorphisms in sepsis. *Crit Care Clin* 25, 835–856
- Niu W, Qi Y, Qian Y, Gao P, Zhu D (2009): The relationship between apolipoprotein E epsilon2/epsilon3/epsilon4 polymorphisms and hypertension: a meta-analysis of six studies comprising 1812 cases and 1762 controls. *Hypertens Res Off J Jpn Soc Hypertens* 32, 1060–1066
- Norda S, Rausch TK, Orlikowsky T, Hütten M, Schulz S, Göpel W, Pecks U (2017): Apolipoprotein E Genotype in Very Preterm Neonates with Intrauterine Growth Restriction: An Analysis of the German Neonatal Network Cohort. *BioMed Res Int* 2017, 2837027

- O'Callaghan ME, Maclennan AH, Gibson CS, McMichael GL, Haan EA, Broadbent JL, Goldwater PN, Painter JN, Montgomery GW, Dekker GA, Australian Collaborative Cerebral Palsy Research Group (2012): Fetal and maternal candidate single nucleotide polymorphism associations with cerebral palsy: a case-control study. *Pediatrics* 129, e414-423
- Ordovas JM, Litwack-Klein L, Wilson PW, Schaefer MM, Schaefer EJ (1987): Apolipoprotein E isoform phenotyping methodology and population frequency with identification of apoE1 and apoE5 isoforms. *J Lipid Res* 28, 371–380
- Oriá RB, Patrick PD, Zhang H, Lorntz B, de Castro Costa CM, Brito GAC, Barrett LJ, Lima AAM, Guerrant RL (2005): APOE4 protects the cognitive development in children with heavy diarrhea burdens in Northeast Brazil. *Pediatr Res* 57, 310–316
- O'Shea M, Savitz DA, Hage ML, Feinstein KA (1992): Prenatal events and the risk of subependymal/intraventricular haemorrhage in very low birthweight neonates. *Paediatr Perinat Epidemiol* 6, 352–362
- Padbury JF, Ervin MG, Polk DH (1996): Extrapulmonary effects of antenatally administered steroids. *J Pediatr* 128, 167–172
- Pane K, Sgambati V, Zanfardino A, Smaldone G, Cafaro V, Angrisano T, Pedone E, Di Gaetano S, Capasso D, Haney EF, Izzo V, Varcamonti M, Notomista E, Hancock REW, Di Donato A, Pizzo E (2016): A new cryptic cationic antimicrobial peptide from human apolipoprotein E with antibacterial activity and immunomodulatory effects on human cells. *FEBS J* 283, 2115–2131
- Payami H, Zhu M, Montimurro J, Keefe R, McCulloch CC, Moses L (2005): One step closer to fixing association studies: evidence for age- and gender-specific allele frequency variations and deviations from Hardy-Weinberg expectations in controls. *Hum Genet* 118, 322–330
- Peck G, Smeeth L, Whittaker J, Casas JP, Hingorani A, Sharma P (2008): The Genetics of Primary Haemorrhagic Stroke, Subarachnoid Haemorrhage and Ruptured Intracranial Aneurysms in Adults. *PLoS ONE* 3, e3691
- Pecks U, Brieger M, Schiessl B, Bauerschlag DO, Piroth D, Bruno B, Fitzner C, Orlikowsky T, Maass N, Rath W (2012): Maternal and fetal cord blood lipids in intrauterine growth restriction. *J Perinat Med* 40, 287–296

- Perlman JM (2009): The relationship between systemic hemodynamic perturbations and periventricular-intraventricular hemorrhage--a historical perspective. *Semin Pediatr Neurol* 16, 191–199
- Phillips MC (2014): Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism. *IUBMB Life* 66, 616–623
- Price DA, Bassendine MF, Norris SM, Golding C, Toms GL, Schmid ML, Morris CM, Burt AD, Donaldson PT (2006): Apolipoprotein epsilon3 allele is associated with persistent hepatitis C virus infection. *Gut* 55, 715–718
- Quinn TJ, Smith C, Murray L, Stewart J, Nicoll J a. R, Graham DI (2004): There is no evidence of an association in children and teenagers between the apolipoprotein E epsilon4 allele and post-traumatic brain swelling. *Neuropathol Appl Neurobiol* 30, 569–575
- Raichlen DA, Alexander GE (2014): Exercise, APOE genotype, and the evolution of the human lifespan. *Trends Neurosci* 37, 247–255
- Rannikmäe K, Kalaria RN, Greenberg SM, Chui HC, Schmitt FA, Samarasekera N, Salman RA-S, Sudlow CL (2014): APOE associations with severe CAA-associated vasculopathic changes – collaborative meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85, 300–305
- Reuter-Rice K, Regier M, Bennett E, Laskowitz D (2018): The Effect of the Relationship of APOE Polymorphisms and Cerebral Vasospasm on Functional Outcomes in Children With Traumatic Brain Injury. *Biol Res Nurs* 20, 566–576
- Roberts D, Brown J, Medley N, Dalziel SR (2017a): Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev* 3, CD004454
- Roberts JC, Javed MJ, Hocker JR, Wang H, Tarantino MD (2017b): Risk factors associated with intraventricular hemorrhage in extremely premature neonates. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb* 29, 25–29
- Roberts WE, Morrison JC (1991): Pharmacologic induction of fetal lung maturity. *Clin Obstet Gynecol* 34, 319–327
- Robine J-M, Cheung SLK, Saito Y, Jeune B, Parker MG, Herrmann FR (2010): Centenarians Today: New Insights on Selection from the 5-COOP Study. *Curr Gerontol Geriatr Res* 2010, 120354

- Robinson S (2012): Neonatal posthemorrhagic hydrocephalus from prematurity: pathophysiology and current treatment concepts. *J Neurosurg Pediatr* 9, 242–258
- Roselaar SE, Daugherty A (1998): Apolipoprotein E-deficient mice have impaired innate immune responses to *Listeria monocytogenes* in vivo. *J Lipid Res* 39, 1740–1743
- Roses AD (1996): Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. *Annu Rev Med* 47, 387–400
- Salmaso N, Jablonska B, Scafidi J, Vaccarino FM, Gallo V (2014): Neurobiology of premature brain injury. *Nat Neurosci* 17, 341–346
- Schächter F, Faure-Delanef L, Guénot F, Rouger H, Froguel P, Lesueur-Ginot L, Cohen D (1994): Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci. *Nat Genet* 6, 29–32
- Schleußner E (2013): The Prevention, Diagnosis and Treatment of Premature Labor. *Dtsch Ärztebl Int* 110, 227–236
- Schrag SJ, Farley MM, Petit S, Reingold A, Weston EJ, Pondo T, Jain JH, Lynfield R (2016): Epidemiology of Invasive Early-Onset Neonatal Sepsis, 2005 to 2014. *Pediatrics* 138, e20162013
- Sebastiani P, Gurinovich A, Nygaard M, Sasaki T, Sweigart B, Bae H, Andersen SL, Villa F, Atzmon G, Christensen K, Arai Y, Barzilai N, Puca A, Christiansen L, Hirose N, Perls TT (2019): APOE Alleles and Extreme Human Longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 74, 44–51
- Seripa D, D'Onofrio G, Panza F, Cascavilla L, Masullo C, Pilotto A (2011): The genetics of the human APOE polymorphism. *Rejuvenation Res* 14, 491–500
- Shankaran S, Bauer CR, Bain R, Wright LL, Zachary J (1995): Relationship between antenatal steroid administration and grades III and IV intracranial hemorrhage in low birth weight infants. The NICHD Neonatal Research Network. *Am J Obstet Gynecol* 173, 305–312
- Shankaran S, Bauer CR, Bain R, Wright LL, Zachary J (1996): Prenatal and perinatal risk and protective factors for neonatal intracranial hemorrhage. National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *Arch Pediatr Adolesc Med* 150, 491–497

- Shankaran S, Lin A, Maller-Kesselman J, Zhang H, O'Shea TM, Bada HS, Kaiser JR, Lifton RP, Bauer CR, Ment LR (2014): Maternal race, demography and health care disparities impact risk for IVH in preterm neonates. *J Pediatr* 164, 1005–1011.e3
- Singh PP, Singh M, Mastana SS (2006): APOE distribution in world populations with new data from India and the UK. *Ann Hum Biol* 33, 279–308
- Singh R, Gorstein SV, Bednarek F, Chou JH, McGowan EC, Visintainer PF (2013): A Predictive Model for SIVH risk in Preterm Infants and Targeted Indomethacin Therapy for Prevention. *Sci Rep* 3, 2539
- Snipes GJ, McGuire CB, Norden JJ, Freeman JA (1986): Nerve injury stimulates the secretion of apolipoprotein E by nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 1130–1134
- Sonnega A, Faul JD, Ofstedal MB, Langa KM, Phillips JWR, Weir DR (2014): Cohort Profile: the Health and Retirement Study (HRS). *Int J Epidemiol* 43, 576–585
- Sørensen TI, Nielsen GG, Andersen PK, Teasdale TW (1988): Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N Engl J Med* 318, 727–732
- Speer CP (2013): Neonatologie. In: Gahr M, Speer CP (Hrsg.): Pädiatrie. 4. Aufl., 125–192, Springer, Berlin
- Statistisches Bundesamt (2015)  
[http://www.gbe bund.de/gbe10/ergebnisse.prc\\_tab?fid=25385&suchstring=fr%FChgeburtlichkeit&query\\_id=&sprache=D&fund\\_typ=txt&methode=2&vt=1&verwandte=1&page\\_ret=0&seite=&p\\_lfd\\_nr=11&p\\_news=&p\\_sprachkz=D&p\\_uid=gast&p\\_a id=62360994&hlp\\_nr=3&p\\_janein=J#SEARCH=%2522fr%C3%BCgeburtlichkeit%2522](http://www.gbe bund.de/gbe10/ergebnisse.prc_tab?fid=25385&suchstring=fr%FChgeburtlichkeit&query_id=&sprache=D&fund_typ=txt&methode=2&vt=1&verwandte=1&page_ret=0&seite=&p_lfd_nr=11&p_news=&p_sprachkz=D&p_uid=gast&p_a id=62360994&hlp_nr=3&p_janein=J#SEARCH=%2522fr%C3%BCgeburtlichkeit%2522) (Tag des Zugriffs: 28.10.2018)
- Sudlow C, Martínez González NA, Kim J, Clark C (2006): Does apolipoprotein E genotype influence the risk of ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, or subarachnoid hemorrhage? Systematic review and meta-analyses of 31 studies among 5961 cases and 17,965 controls. *Stroke* 37, 364–370
- Szitányi P, Pistulková H, Hubácek JA, Stuchlíková H, Poledne R (2008): Apolipoprotein E/intrauterine undernutrition interaction and hypercholesterolemia in children. *Physiol Res* 57, 965–968

- Szpecht D, Szymankiewicz M, Seremak-Mrozikiewicz A, Gadzinowski J (2015): The role of genetic factors in the pathogenesis of neonatal intraventricular hemorrhage. *Folia Neuropathol* 53, 1–7
- Szpecht D, Szymankiewicz M, Nowak I, Gadzinowski J (2016): Intraventricular hemorrhage in neonates born before 32 weeks of gestation—retrospective analysis of risk factors. *Childs Nerv Syst* 32, 1399–1404
- Szymonowicz W, Schafler K, Cussen LJ, Yu VY (1984): Ultrasound and necropsy study of periventricular haemorrhage in preterm infants. *Arch Dis Child* 59, 637–642
- Teasdale GM, Murray GD, Nicoll J a. R (2005): The association between APOE epsilon4, age and outcome after head injury: a prospective cohort study. *Brain J Neurol* 128, 2556–2561
- Thermo Fisher Scientific (2010)  
[https://assets.thermofisher.com/TFS-ArtsAssets/LSG/manuals/cms\\_041290.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-ArtsAssets/LSG/manuals/cms_041290.pdf) (Tag des Zugriffs: 28.10.2018)
- Treble-Barna A, Zang H, Zhang N, Martin LJ, Yeates KO, Taylor HG, Wade SL, Kurowski BG (2016): Does Apolipoprotein e4 Status Moderate the Association of Family Environment with Long-Term Child Functioning following Early Moderate to Severe Traumatic Brain Injury? A Preliminary Study. *J Int Neuropsychol Soc JINS* 22, 859–864
- Trusca VG, Fuior EV, Fenyo IM, Kardassis D, Simionescu M, Gafencu AV (2017): Differential action of glucocorticoids on apolipoprotein E gene expression in macrophages and hepatocytes. *PLoS ONE* 12, e0174078
- Tsoi L-M, Wong K-Y, Liu Y-M, Ho Y-Y (2007): Apoprotein E isoform-dependent expression and secretion of pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-6 in macrophages. *Arch Biochem Biophys* 460, 33–40
- Tzourio C, Arima H, Harrap S, Anderson C, Godin O, Woodward M, Neal B, Bousser M-G, Chalmers J, Cambien F, MacMahon S (2008): APOE genotype, ethnicity, and the risk of cerebral hemorrhage. *Neurology* 70, 1322–1328
- Utermann G (1987): Apolipoprotein E polymorphism in health and disease. *Am Heart J* 113, 433–440

- Vance JE, Hayashi H (2010): Formation and function of apolipoprotein E-containing lipoproteins in the nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1801, 806–818
- van den Elzen P, Garg S, León L, Brigl M, Leadbetter EA, Gumperz JE, Dascher CC, Cheng T-Y, Sacks FM, Illarionov PA, Besra GS, Kent SC, Moody DB, Brenner MB (2005): Apolipoprotein-mediated pathways of lipid antigen presentation. *Nature* 437, 906–910
- Van Oosten M, Rensen PCN, Van Amersfoort ES, Van Eck M, Van Dam A-M, Brevé JJP, Vogel T, Panet A, Berkel TJCV, Kuiper J (2001): Apolipoprotein E Protects Against Bacterial Lipopolysaccharide-induced Lethality A NEW THERAPEUTIC APPROACH TO TREAT GRAM-NEGATIVE SEPSIS. *J Biol Chem* 276, 8820–8824
- Vogtmann C, Koch R, Gmyrek D, Kaiser A, Friedrich A (2012): Risk-Adjusted Intraventricular Hemorrhage Rates in Very Premature Infants. *Dtsch Ärztebl Int* 109, 527–533
- Voigt M, Rochow N, Guthmann F, Hesse V, Schneider KTM, Schnabel D (2012): [Birth weight percentile values for girls and boys under consideration of maternal height]. *Z Geburtshilfe Neonatol* 216, 212–219
- Waitz M, Nusser S, Schmid MB, Dreyhaupt J, Reister F, Hummler H (2016): Risk Factors Associated with Intraventricular Hemorrhage in Preterm Infants with  $\leq 28$  Weeks Gestational Age. *Klin Padiatr* 228, 245–250
- Wallace EM, Baker LS (1999): Effect of antenatal betamethasone administration on placental vascular resistance. *Lancet Lond Engl* 353, 1404–1407
- Wang DG, Fan J-B, Siao C-J, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglu T, Hubbell E, Robinson E, Mittmann M, Morris MS, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson TJ, Lipshutz R, Chee M, Lander ES (1998): Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome. *Science* 280, 1077–1082
- Wang H, Christensen DJ, Vitek MP, Sullivan PM, Laskowitz DT (2009): APOE genotype affects outcome in a murine model of sepsis: implications for a new treatment strategy. *Anaesth Intensive Care* 37, 38–45

- Wei JC, Catalano R, Profit J, Gould JB, Lee HC (2016): Impact of Antenatal Steroids on Intraventricular Hemorrhage in Very Low Birth Weight Infants. *J Perinat Off J Calif Perinat Assoc* 36, 352–356
- Wen HM, Baum L, Cheung WS, Mok V, Lam WWM, Tomlinson B, Wong KS, Ng HK (2006): Apolipoprotein E epsilon4 allele is associated with the volume of white matter changes in patients with lacunar infarcts. *Eur J Neurol* 13, 1216–1220
- Westlye LT, Reinvang I, Rootwelt H, Espeseth T (2012): Effects of APOE on brain white matter microstructure in healthy adults. *Neurology* 79, 1961–1969
- Wilson PW, Myers RH, Larson MG, Ordovas JM, Wolf PA, Schaefer EJ (1994): Apolipoprotein E alleles, dyslipidemia, and coronary heart disease. The Framingham Offspring Study. *JAMA* 272, 1666–1671
- Woo D, Kaushal R, Chakraborty R, Woo J, Haverbusch M, Sekar P, Kissela B, Pancioli A, Jauch E, Kleindorfer D, Flaherty M, Schneider A, Khatri P, Sauerbeck L, Khouri J, Deka R, Broderick J (2005): Association of apolipoprotein E4 and haplotypes of the apolipoprotein E gene with lobar intracerebral hemorrhage. *Stroke* 36, 1874–1879
- Wright LL, Horbar JD, Gunkel H, Verter J, Younes N, Andrews EB, Long W (1995): Evidence from multicenter networks on the current use and effectiveness of antenatal corticosteroids in low birth weight infants. *Am J Obstet Gynecol* 173, 263–269
- Wright RO, Hu H, Silverman EK, Tsaih SW, Schwartz J, Bellinger D, Palazuelos E, Weiss ST, Hernandez-Avila M (2003): Apolipoprotein E genotype predicts 24-month bayley scales infant development score. *Pediatr Res* 54, 819–825
- Wu Y, Pang J, Peng J, Cao F, Vitek MP, Li F, Jiang Y, Sun X (2016): An apoE-derived mimic peptide, COG1410, alleviates early brain injury via reducing apoptosis and neuroinflammation in a mouse model of subarachnoid hemorrhage. *Neurosci Lett* 627, 92–99
- Xu Q, Bernardo A, Walker D, Kanegawa T, Mahley RW, Huang Y (2006): Profile and Regulation of Apolipoprotein E (ApoE) Expression in the CNS in Mice with Targeting of Green Fluorescent Protein Gene to the ApoE Locus. *J Neurosci* 26, 4985–4994
- Yu J-T, Tan L, Hardy J (2014): Apolipoprotein E in Alzheimer's disease: an update. *Annu Rev Neurosci* 37, 79–100

- Zannis VI, Just PW, Breslow JL (1981): Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. *Am J Hum Genet* 33, 11–24
- Zeng S, Jiang J-X, Xu M-H, Xu L-S, Shen G-J, Zhang A-Q, Wang X-H (2014): Prognostic value of apolipoprotein E epsilon4 allele in patients with traumatic brain injury: a meta-analysis and meta-regression. *Genet Test Mol Biomark* 18, 202–210
- Zhang H-L, Wu J, Zhu J (2010): The Immune-Modulatory Role of Apolipoprotein E with Emphasis on Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Clin Dev Immunol* 2010
- Zhang R, Wang X, Tang Z, Liu J, Yang S, Zhang Y, Wei Y, Luo W, Wang J, Li J, Chen B, Zhang K (2014): Apolipoprotein E gene polymorphism and the risk of intracerebral hemorrhage: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Lipids Health Dis* 13, 47
- Zhou W, Xu D, Peng X, Zhang Q, Jia J, Crutcher KA (2008): Meta-analysis of APOE4 allele and outcome after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 25, 279–290

# A Anhang

## A.1 Einverständniserklärung der Eltern

Studie „Deutsches Frühgeborenen-Netzwerk (German Neonatal Network, GNN)“

### Einverständniserklärung

Hiermit erkläre/n ich/wir mein/unser Einverständnis zur Teilnahme meines(r)/unseres(r) Kindes(r)

geb. am \_\_\_\_\_

an der Studie „Deutsches Frühgeborenen-Netzwerk (German Neonatal Network)“

Ich habe die schriftliche Patienteninformation zur oben genannten Studie erhalten, gelesen und verstanden. Ich wurde ausführlich – mündlich und schriftlich – über das Ziel und den Verlauf der Studie aufgeklärt.

Ich wurde darauf hingewiesen, dass die Teilnahme meines Kindes freiwillig ist und dass ich das Recht habe, diese jederzeit ohne Angabe von Gründen zu beenden, ohne das mir oder meinem Kind dadurch Nachteile entstehen.

Ich bin darüber aufgeklärt und einverstanden, dass die klinischen Verlaufsdaten meines Kindes und meine Anschrift an die Studienzentrale (Kinderklinik der Universität Lübeck) weitergeleitet werden und dass meine Anschriftendaten (z.B. im Fall eines Wohnortwechsels) mit der mein Kind behandelnden Klinik oder dem Einwohnermelderegister abgeglichen werden.

Ich bin darüber informiert, dass die entnommenen Proben ausschließlich in anonymisierter Form zur Erforschung von Einflussfaktoren für Erkrankungen des Frühgeborenen und Frühgeburtlichkeit genutzt werden und dass eine Befundmitteilung der genetischen Daten weder an mich noch an die mein Kind behandelnden Ärzte erfolgen kann.

Ich/wir hatte/n Gelegenheit, alle meine/unsere Fragen zu stellen, diese wurden zufriedenstellend und vollständig beantwortet.

---

Ort, Datum

Unterschrift des/der Erziehungsberechtigten

---

Ort, Datum

Aufklärender Arzt/Ärztin (Name)

Aufklärender Arzt/Ärztin (Unterschrift)

## A.2 Dokumentationsbogen 1 der GNN-Studie

 01 - V 5	Name Kind: _____ Geburtstag: _____									
Stand: Version 5 31.10.2014										
<b>Einschluss 1 / 3</b>										
Straße; Haus-Nr.: _____		Name Mutter: _____								
PLZ; Wohnort: _____		Eingang im Labor (Datum): _____		EV ?: _____		Klinik: _____				
<b>1. Einschluss</b> ja    nein										
Nabelschnurrest eingefroren? <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> Einschluss nur bei Outborn? <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> → Übernahme am 1. LT!										
<b>2. Geschlecht:</b> <input checked="" type="checkbox"/> weiblich <input type="checkbox"/> männlich										
<b>3. Mehrling</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/>										
Nr. des Mehrlings: _____ von _____ Mehrlingen										
Fetofetales Transfusionssyndrom? nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> ja, mit Laser <input type="checkbox"/>										
<b>4. Informationen zur Geburt</b> nein    ja										
Blasensprung vor Wehen? <input type="checkbox"/> ↓ <input type="checkbox"/>										
falls "ja": _____      Datum: _____ Uhrzeit: _____										
<b>Geburtsmodus:</b> Spontangeburt <input type="checkbox"/> Sectio <input type="checkbox"/> Notsectio <input type="checkbox"/>										
APGAR 5 Minuten <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle; text-align: center;">_____</table>										
APGAR 10 Minuten <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle; text-align: center;">_____</table>										
Nabelarterien-ph: <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle; text-align: center;">_____</table>										
Nabelarterien BE (+/-): <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle; text-align: center;">_____</table> (+ / -)										
<b>5. Geburtsdaten / Gestationsalter (GA)</b>										
GG: _____ g    Körpertemp.: _____ °C										
KL: _____ cm    GA: _____ + _____										
KU: _____ cm										
<b>6. Erstversorgung - Uhrzeit Geburt:</b> _____										
Maskenbeatmung <input type="checkbox"/> Intubation <input type="checkbox"/> CPAP <input type="checkbox"/> Adrenalin <input type="checkbox"/> Pufferung <input type="checkbox"/> Herzdruckmassage <input type="checkbox"/> Volumensubstitution <input type="checkbox"/> Keine dieser Maßnahmen <input type="checkbox"/>										
Lactat in erster Blutentnahme <input type="checkbox"/> → <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle; text-align: center;">_____</table> <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle; text-align: center;">_____</table> mmol/l										
Uhrzeit erste Blutentnahme: → <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle; text-align: center;">_____</table> <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle; text-align: center;">_____</table> <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle; text-align: center;">_____</table>										
<b>7. CRIB-Score (erste 12h)</b>										
Niedrigster BE (+/-)      min. O2: _____ %    max. O2: _____ %										
<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle; text-align: center;">_____</table> mmol/l <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle; text-align: center;">_____</table> % <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle; text-align: center;">_____</table> %										
→ Wenn "N.-BE" > 0, dann eine "98" dokumentieren.										
<b>8. Angeborene Fehlbildungen:</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nicht lebensbedr. <input type="checkbox"/> akut lebensbedr. <input type="checkbox"/> letal <input type="checkbox"/>										
<b>9. Niedrigster MAD (innerhalb der ersten 24 h)</b>										
Manschette <input type="checkbox"/> Arterie <input type="checkbox"/> mmHg										
<b>10. Katecholamine in d. ersten 24h?</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/>										
Von Lübeck auszufüllen: _____ Scann: _____ Eingabe _____ Monitor _____ korrig. Eingabe _____										
<small>Datenbogen des Kindes bitte ausfüllen und zusammen mit je zwei Mundschleimhautabstrichen von Mutter und Kind an die Studienzentrale senden.: Klinik für Kinder und Jugendmedizin, Prof. Dr. W. Göpel, 23538 Lübeck</small>										
<small>Wenn ja: keine römischen Zahlen</small>										
Gravida: (ohne diese Geburt) <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle; text-align: center;">_____</table> Para: (ohne diese Geburt) <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle; text-align: center;">_____</table>										
Frühgeburten vor 37 + 0 SSW?: nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> <small>(ohne diese Geburt)</small>										
Hiermit bestätige ich die Richtigkeit der Angaben: <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle; text-align: center; width: 100px; height: 40px;"></table>										
Name / Unterschrift (dokum. Arzt / Ärztin): <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle; text-align: center; width: 100px; height: 40px;"></table>										

### A.3 Dokumentationsbogen 2 der GNN-Studie

02 - V 5		Name Kind:	
 <b>Behandlung 2 / 3</b> Stand: Version 5 31.10.2014		Geburtsstag: _____ . _____ . _____	
		Klinik: _____ Nr.: _____	
<b>1. Prophylaktische Medikamente</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/>			
Vitamin K : nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> oral <input type="checkbox"/> i.m. <input type="checkbox"/> i.v. <input type="checkbox"/> s.c. <input type="checkbox"/> Teicoplanin/Vanco zur Sepsis-Prophylaxe <input type="checkbox"/> Fluconazol zur Pilzsepsis-Prophylaxe <input type="checkbox"/> Indomethacin zur Prophylaxe der IVH <input type="checkbox"/> Erythropoetin zur Anämie-Prophylaxe <input type="checkbox"/>			
<b>10. Sonstige Medikamente</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/>			
Acetylcystein <input type="checkbox"/> Hydrocortison <input type="checkbox"/> Omeprazol <input type="checkbox"/> Ambroxol <input type="checkbox"/> Ibuprofen <input type="checkbox"/> Phosphat <input type="checkbox"/> Ca-Gluconat <input type="checkbox"/> Indometacin <input type="checkbox"/> Prednisolon <input type="checkbox"/> Ca-Glycerolph. <input type="checkbox"/> Insulin <input type="checkbox"/> Ranitidin <input type="checkbox"/> Calcium <input type="checkbox"/> L_Thyroxin <input type="checkbox"/> Sildenafil <input type="checkbox"/> Ca-Phosph. <input type="checkbox"/> Na-Gluconat <input type="checkbox"/> Ursodesoxych.-Säure <input type="checkbox"/> Dexamethason <input type="checkbox"/> Na-Glyceroph. <input type="checkbox"/> Vitamine-nicht D <input type="checkbox"/> Eisen <input type="checkbox"/> Na-bicarbonat <input type="checkbox"/> Zink <input type="checkbox"/> Glucose <input type="checkbox"/> NaCl <input type="checkbox"/>			
<b>2. Antibiotische Therapie</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/>			
Amikacin <input type="checkbox"/> Clarithromycin <input type="checkbox"/> Meropenem <input type="checkbox"/> AmphotericinB <input type="checkbox"/> Erythromycin <input type="checkbox"/> Metronidazol <input type="checkbox"/> Ampi/Ampoxicillin <input type="checkbox"/> Flocloxacill. <input type="checkbox"/> Mezlocillin <input type="checkbox"/> Ampi/Sulbactam <input type="checkbox"/> Fluconazol <input type="checkbox"/> Piperacillin <input type="checkbox"/> Cefazolin <input type="checkbox"/> Fosfomycin <input type="checkbox"/> Tazobactam <input type="checkbox"/> Cefotaxim <input type="checkbox"/> Gentamicin <input type="checkbox"/> Teicoplanin <input type="checkbox"/> Ceftazidim <input type="checkbox"/> Imipenem <input type="checkbox"/> Tobramycin <input type="checkbox"/> Cefuroxim <input type="checkbox"/> Linezolid <input type="checkbox"/> Vancomycin <input type="checkbox"/>			
<b>11. Probiotika</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/>			
Lactobacillus + Bifidobacterium (z.B.Infloran®) <input type="checkbox"/> Lactobacillus GG (z.B. Infectopharm LGG®) <input type="checkbox"/> E-coli (z.B. Mutaflor®) <input type="checkbox"/>			
<b>3. Katecholamin-Therapie</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/>			
Dopamin <input type="checkbox"/> Dobutamin <input type="checkbox"/> Noradrenalin <input type="checkbox"/> Adrenalin <input type="checkbox"/>			
<b>4. Analgetika u. Sedativa</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/>			
Paracetamol <input type="checkbox"/> Midazolam <input type="checkbox"/> Piritramid <input type="checkbox"/> Morphin <input type="checkbox"/> Fentanyl <input type="checkbox"/> Sufentanil <input type="checkbox"/> Thiopental <input type="checkbox"/> Phenobarbital <input type="checkbox"/> Propofol <input type="checkbox"/> Pentobarbital <input type="checkbox"/> Chloralhydrat <input type="checkbox"/> Diazepam <input type="checkbox"/> Andere <input type="checkbox"/>			
<b>5. Surfactantgabe</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/>			
Wenn ja, bitte Anzahl und Darreichungsform angeben: _____ X mit Sonde / Spontanatmung <input type="checkbox"/> mit Tubus <input type="checkbox"/>			
<b>6. Diuretika</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/>			
Furosemid (Lasix) <input type="checkbox"/> Hydrochlorothiazid <input type="checkbox"/> Spironolacton (Aldactone) <input type="checkbox"/>			
<b>7. Inhalative Medikamente</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/>			
Salbutamol <input type="checkbox"/> Budesonid <input type="checkbox"/> Atrovent <input type="checkbox"/> Furosemid <input type="checkbox"/> Sultanol <input type="checkbox"/> Flutide <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> Pulmicort <input type="checkbox"/>			
<b>8. Transfusionen "bitte komplett ausfüllen"</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/>			
Keine <input type="checkbox"/> 1x <input type="checkbox"/> 2x <input type="checkbox"/> 3x <input type="checkbox"/> Anzahl bei > 3 x: _____ X Blut (EK): <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> FFP: → <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> TK: → <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
Wenn "ja", dann auch "Keine" angeb., da freie Felder als "keine Angabe" geführt werden.			
<b>9. Atemanalept. Medikamente</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/>			
Coffein <input type="checkbox"/> Theophyllin <input type="checkbox"/> Doxapram <input type="checkbox"/>			
Datenbogen des Kindes bitte ausfüllen und zusammen mit dem Bogen 3 (grün) nach Entlassung/Verlegung ohne wieder Aufnahme des Kindes an die Studienzentrale senden.: Klinik für Kinder und Jugendmedizin, Prof. Dr. W. Göpel, 23538 Lübeck			
Von Lübeck auszufüllen: _____ Scann: _____ Eingabe _____ Monitor _____ korrig. Eingabe _____			
Hiermit bestätige ich die Richtigkeit der Angaben: Name / Unterschrift (dokum. Arzt / Ärztin)			

## A.4 Dokumentationsbogen 3 der GNN-Studie

03 - V 5		Name Kind:																																											
 <b>Verlauf 3 / 3</b> Stand: Version 5 31.10.2014		Geburtstag: _____ Klinik: _____ Nr.: _____																																											
<b>1. Sauerstoffzufuhr</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input checked="" type="checkbox"/> Beginn : _____ Endg. Beendigung: _____																																													
Wenn das Kind mit O2-Bedarf entlassen wurde, dann entspricht "Endg. Beendigung" dem Entlassungsdatum.																																													
<b>2. CPAP</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input checked="" type="checkbox"/> CPAP CPAP mit Beatmungshüben (nasal/pharyngeal) HFO - CPAP Endg. Beendigung dieser Atemhilfen bitte unten bei Punkt 4 angeben. Highflow _____																																													
<b>3. Beatmungsmodus</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input checked="" type="checkbox"/> Konventionelle Beatmung (IMV; SIMV; etc.) Hochfrequenzoszillation (HFO)																																													
<b>4. Tracheale Beatmungszeiten (+ Beatmng. bei OP)</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input checked="" type="checkbox"/> 1. Beatmng. vom _____ bis _____ 2. Beatmng. vom _____ bis _____ 3. Beatmng. vom _____ bis _____ 4. Beatmng. vom _____ bis _____ 5. Beatmng. vom _____ bis _____ 6. Beatmng. vom _____ bis _____ 7. Beatmng. vom _____ bis _____ Endg. Beendigung jegl. Langzeit-Atemhilfe (CPAP / tr. Beatmung / u. a.) <input type="checkbox"/>																																													
<b>5. Pneumothorax / PIE</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input checked="" type="checkbox"/> PIE <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <b>Pneumothorax mit Drainage</b> <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> Lebenstag - unter trachealer Beatmung <input type="checkbox"/> - unter CPAP <input type="checkbox"/> - Spontanatmung <input type="checkbox"/>																																													
<b>6. Sepsis/SIRS (Kriterien NEO-KISS)</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input checked="" type="checkbox"/> Beginn innerhalb 72h? <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> !!! Erreger in Blutkultur? <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> Erreger-Nr.: <input type="checkbox"/> Datum: <input type="checkbox"/> Erreger nachweis: <input type="checkbox"/> 1. Sepsis: <input type="checkbox"/> → <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 2. Sepsis: <input type="checkbox"/> → <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 3. Sepsis: <input type="checkbox"/> → <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Andere Sepsiserreger: _____ → _____																																													
<b>Erregerkatalog:</b> <table border="1"> <tr> <td>kein Keimnachweis</td> <td>00</td> <td>00</td> </tr> <tr> <td>Enterokokken</td> <td>ENT</td> <td>34</td> </tr> <tr> <td>Enterobacter</td> <td>ENB</td> <td>39</td> </tr> <tr> <td>Pseudomonas aeruginosa</td> <td>PAE</td> <td>42</td> </tr> <tr> <td>Staphylococcus epidermidis</td> <td>KNS</td> <td>32</td> </tr> <tr> <td>Staphylococcus aureus</td> <td>SAU</td> <td>31</td> </tr> <tr> <td>Staphylococcus aureus Oxacillin resist.</td> <td>MRSA</td> <td>51</td> </tr> <tr> <td>E. coli ESBL bildend</td> <td>ESBL_ECO</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>Klebsiella ESBL bildend</td> <td>ESBL_KLE</td> <td>53</td> </tr> <tr> <td>E. faecium/ E. faecalis Vancomycin resist.</td> <td>VRE</td> <td>52</td> </tr> <tr> <td>Serratia</td> <td>SER</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>Listeria monocytogene</td> <td>LMO</td> <td>43</td> </tr> <tr> <td>Candida</td> <td>CAN</td> <td>46</td> </tr> <tr> <td>Streptococcus Gruppe B</td> <td>BST</td> <td>33</td> </tr> </table>				kein Keimnachweis	00	00	Enterokokken	ENT	34	Enterobacter	ENB	39	Pseudomonas aeruginosa	PAE	42	Staphylococcus epidermidis	KNS	32	Staphylococcus aureus	SAU	31	Staphylococcus aureus Oxacillin resist.	MRSA	51	E. coli ESBL bildend	ESBL_ECO	50	Klebsiella ESBL bildend	ESBL_KLE	53	E. faecium/ E. faecalis Vancomycin resist.	VRE	52	Serratia	SER	40	Listeria monocytogene	LMO	43	Candida	CAN	46	Streptococcus Gruppe B	BST	33
kein Keimnachweis	00	00																																											
Enterokokken	ENT	34																																											
Enterobacter	ENB	39																																											
Pseudomonas aeruginosa	PAE	42																																											
Staphylococcus epidermidis	KNS	32																																											
Staphylococcus aureus	SAU	31																																											
Staphylococcus aureus Oxacillin resist.	MRSA	51																																											
E. coli ESBL bildend	ESBL_ECO	50																																											
Klebsiella ESBL bildend	ESBL_KLE	53																																											
E. faecium/ E. faecalis Vancomycin resist.	VRE	52																																											
Serratia	SER	40																																											
Listeria monocytogene	LMO	43																																											
Candida	CAN	46																																											
Streptococcus Gruppe B	BST	33																																											
Datenbogen des Kindes bitte ausfüllen und zusammen mit dem Bogen 2 (gelb) nach Entlassung/Verlegung ohne wieder Aufnahme des Kindes an die Studienzentrale senden: Klinik für Kinder und Jugendmedizin, Prof. Dr. W. Göpel, 23538 Lübeck																																													
<b>7. Pneumonie / NEC (Kriterien NEO-KISS)</b> Pneumonie: nein <input type="checkbox"/> ja <input checked="" type="checkbox"/> vor 72 h <input type="checkbox"/> nach 72h <input type="checkbox"/> NEC II / III (auch ohne OP): <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>																																													
<b>8. Schädelsonogramm</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input checked="" type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja <input checked="" type="checkbox"/> Grad: I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> IVH <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> → <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> PVL <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>																																													
<b>9. Hüftsono</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input checked="" type="checkbox"/> Hüftgelenksdyspl. >= 2 nach Graf nein <input type="checkbox"/> ja <input checked="" type="checkbox"/>																																													
<b>10. Ophthalmol. Untersuchung</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input checked="" type="checkbox"/> max. ROP-Stadium: <input type="checkbox"/> → Ziffern 0 bis 5 ; Ø entspricht 0 nein <input type="checkbox"/> ja <input checked="" type="checkbox"/> Datum: links <input type="checkbox"/> rechts <input type="checkbox"/> bds. <input type="checkbox"/> Bevacizumab (Bsp.: Avastin) <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Laser <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Kryo <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> _____ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>																																													
<b>11. Apparatives Hörscreening</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input checked="" type="checkbox"/> unauffällig → <input type="checkbox"/> auffällig → <input type="checkbox"/>																																													
<b>12. Operationen</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input checked="" type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja <input checked="" type="checkbox"/> Datum <table border="1"> <tr><td>PDA-OP</td><td>_____</td></tr> <tr><td>NEC-OP</td><td>_____</td></tr> <tr><td>FIP-OP</td><td>_____</td></tr> <tr><td>VP-Shunt</td><td>_____</td></tr> <tr><td>Herniotomie</td><td>_____</td></tr> <tr><td>Sonst. OPs?</td><td>_____</td></tr> </table>				PDA-OP	_____	NEC-OP	_____	FIP-OP	_____	VP-Shunt	_____	Herniotomie	_____	Sonst. OPs?	_____																														
PDA-OP	_____																																												
NEC-OP	_____																																												
FIP-OP	_____																																												
VP-Shunt	_____																																												
Herniotomie	_____																																												
Sonst. OPs?	_____																																												
<u>Art der OP (Freitext in Druckbuchstaben):</u>																																													
<b>13. BPD (nach Walsh, 35+0 bis 36+6 SSW)</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input checked="" type="checkbox"/> O2-Bedarf < 30% (moderat) <input type="checkbox"/> O2-Bedarf > 30%, CPAP od. Beatmung (schwer) <input type="checkbox"/>																																													
<b>14. Entlassung/Verlegung (ohne Wiederaufnahme!)</b> !!! Datum Entlassung: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Gewicht: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Gramm KU: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> cm KL: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> cm nach Hause <input type="checkbox"/> Verlegt <input type="checkbox"/> → Grund: _____ Tod in Klinik <input type="checkbox"/> → Grund: _____																																													
Von Lübeck: _____ Scann: _____ Eingabe: _____ Monitor: _____ korrig. Eingabe: _____ <b>Hiermit bestätige ich die Richtigkeit der Angaben:</b> <b>Name / Unterschrift (dokum. Arzt / Ärztin)</b>																																													

## A.5 Dokumentationsbogen 4 der GNN-Studie

04 - V 5		Name Kind:	
 <b>Verlauf nach Verlegung (4)</b> Stand: Version 5 31.10.2014		Geburtsdatum: Klinik: Nr.:	
<b>1. Sauerstoffzufuhr</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> Beginn : _____ Endg. Beendigung: _____		<small>Wenn das Kind mit O2-Bedarf entlassen wurde, dann entspricht "Endg. Beendigung" dem Entlassungsdatum.</small>	
<b>Sauerstoffbedarf bei Entlassung?</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/>			
<b>2. CPAP</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> CPAP CPAP mit Beatmungshüben (nasal/pharyngeal) HFO - CPAP Endg. Beendigung dieser Atemhilfen bitte unten bei Punkt 4 angeben. Highflow		<small>Wenn keine Angaben vorhanden, bitte das Zeichen ( „?“ oder „?“ ) neben das Textfeld setzen !!!</small>	
<b>3. Beatmungsmodus</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> Konventionelle Beatmung (IMV; SIMV; etc.) Hochfrequenzoszillation (HFO)		<b>8. Schädelsonogramm</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> IVH <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> Grad: I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> PVL <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/>	
<b>4. Tracheale Beatmungszeiten (+ Beatmng. bei OP)</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> 1. Beatmng. vom _____ bis _____ 2. Beatmng. vom _____ bis _____ 3. Beatmng. vom _____ bis _____ 4. Beatmng. vom _____ bis _____ 5. Beatmng. vom _____ bis _____ 6. Beatmng. vom _____ bis _____ 7. Beatmng. vom _____ bis _____ Endg. Beendigung jegl. Langzeit-Atemhilfe (CPAP / tr. Beatmung / u. a.)		<b>10. Ophthalmol. Untersuchung</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> max. ROP-Stadium: <input type="checkbox"/> → Ziffern 0 bis 5 ; Ø entspricht 0 nein ja Datum: links <input type="checkbox"/> rechts <input type="checkbox"/> bds. <input type="checkbox"/> Bevacizumab (Bsp.: Avastin) <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> Laser <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> Kryo <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/>	
<b>Beatmung bei Entlassung?</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/>		<b>11. Apparatives Hörscreening</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> unauffällig → <input type="checkbox"/> auffällig → <input type="checkbox"/>	
<b>6. Sepsis/SIRS (Kriterien NEO-KISS)</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> Beginn innerhalb 72h ? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> !!! Erreger in Blutkultur? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/>		<b>12. Operationen</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> PDA-OP <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> Datum: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> NEC-OP <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> FIP-OP <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> VP-Shunt <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> Herniotomie <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> Sonst. OPs? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/>	
<u>Art der OP (Freitext in Druckbuchstaben):</u>			
<b>13. BPD (nach Walsh, 35+0 bis 36+6 SSW)</b> nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> O2-Bedarf < 30% (moderat) <input type="checkbox"/> O2-Bedarf > 30%, CPAP od. Beatmung (schwer) <input type="checkbox"/>		<b>14. Entlassung/Verlegung (ohne Wiederaufnahme!)</b>	
<b>!!! Datum Entlassung:</b> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
Gewicht: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Gramm: _____ cm: _____		KU: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> KL: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> cm	
nach Hause <input type="checkbox"/>			
Tod in Klinik <input type="checkbox"/> → Grund: _____			
Von Lübeck auszufüllen: Scann: Eingabe Monitor korr. Eingabe			
<small>Hiermit bestätige ich die Richtigkeit der Angaben:</small>			
<small>Name / Unterschrift (dokum. Arzt / Ärztin)</small>			

Datenbogen des Kindes bitte ausfüllen und zusammen mit dem Bogen 2 (gelb) nach Entlassung/Verlegung ohne wieder Aufnahme des Kindes an die Studienzentrale senden.: Klinik für Kinder und Jugendmedizin, Prof. Dr. W. Göpel, 23538 Lübeck

## A.6 Protokoll zur DNA-Isolierung aus Mundschleimhaut-Abstrichen

Die in diesem Protokoll beschriebene DNA-Isolierung aus Nabelschnüren erfolgt mittels QIAamp® DNA Mini Kit der Firma QIAGEN.

Protease auftauen, Thermoschüttler auf 56°C vorheizen und

1. Eppendorf Reaktionsgefäße (Eppis) beschriften und Abstrichtupfer kurz hinein brechen (mit Deckel festhalten)
2. + 400 µl PBS
3. + 400 µl AL-Puffer und + 20 µl Protease (jeweils nur 2 Eppis zurzeit) → sofort 15 Sekunden vortexen
4. 1 Stunde (maximal 1,5 Stunden) bei 56°C im Thermoschüttler inkubieren, Speed 500
5. in der Zeit Säulen-Tubes und Eppis beschriften
6. + 400 µl absolut Ethanol → vortexen
7. 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugieren
8. 600 µl Probe auf identisch beschriftete Säulen-Tubes geben
9. 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugieren
10. Säulen in neue 2 ml-Eppis setzen und restliches Material rüber pipettieren (Tupfer ausdrücken)
11. 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugieren
12. Säulen in neue 2 ml-Eppis setzen
13. + 500 µl Waschpuffer 1
14. 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugieren
15. Säulen in neue 2 ml-Eppis setzen
16. + 500 µl Waschpuffer 2
17. 3 Minuten bei 13200 rpm zentrifugieren
18. Säulen in beschriftete Eppis setzen
19. + 200 µl AE-Puffer
20. 1,5 Minuten bei 9600 rpm zentrifugieren (DNA ist nun im Eppi)

21. erneut + 200 µl AE-Puffer
22. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
23. 1,5 Minuten bei 9600 rpm zentrifugieren
24. Säulen verwerfen
25. Eppis mit DNA einfrieren

## A.7 Protokoll zur DNA-Isolierung aus Nabelschnüren

Die in diesem Protokoll beschriebene DNA-Isolierung aus Nabelschnüren erfolgt mittels Genta® Puregene® Tissue Kit der Firma QIAGEN.

1. Nabelschnur ca. 100 mg kleingeschnitten → + 3 ml Cell Lysis Solution → + 15 µl Puregene Proteinase K → VORTEXEN (Gewebe muss komplett in der Lösung sein) → über Nacht bei 55°C im Thermoschüttler inkubieren, Speed 600
2. + 13 µl RNase A Solution → VORTEXEN; für 1 Stunde bei 37°C im Thermoschüttler inkubieren, Speed 600
3. Für ca. 3 Minuten ins Gefrierfach
4. +1 ml Protein Precipitation Solution und 20 Sekunden gut vortexen (alles auf Eis pipettieren)
5. 10 Minuten bei 5000 rpm zentrifugieren: Die Proteine sollten jetzt in Form eines Pellets am Boden des Röhrchens sein, die DNA im Überstand
6. DNA-Überstand in ein neues Röhrchen mit 1 ml Protein Precipitation Solution überführen, vortexen und die Proteinfällung wiederholen (10 Minuten bei 5000 rpm) → auf Eis pipettieren
7. 3 ml Isopropanol 100 % in ein neues Röhrchen pipettieren
8. DNA-Überstand dazugeben und das Röhrchen vorsichtig über Kopf schwenken, bis DNA komplett ausgefällt ist in Form von einem „DNA-Faden“
9. 5 Minuten bei 5000 rpm zentrifugieren DNA sollte jetzt als Pellet am Boden des Röhrchens sein
10. Überstand vorsichtig in den Abfall abgießen und das Röhrchen kopfüber auf ein sauberes Papier abtupfen
11. + 3 ml Ethanol 70 % (700 ml ETOH absolut + 300 ml Aqua dest.), Probe durchspülen, um das DNA-Pellet zu waschen
12. 5 Minuten bei 5000 rpm zentrifugieren
13. Alkohol vorsichtig in den Abfall abgießen, Röhrchen über Kopf auf Papier abtupfen
14. Ethanolwaschschrift wiederholen → 5 Minuten, 5000rpm zentrifugieren
15. Röhrchen über Kopf auf sauberem Papier für ca. 2 Stunden lufttrocknen lassen

16. + 150 - 1000 µl DNA Hydration Solution kleines Pellet: 150µl, ansonsten 300-1000µl DNA Hydration Solution; vorsichtig mit Pipette durchspülen
17. über Nacht bei 25°C im Thermoschüttler inkubieren, Speed 300
18. DNA-Lösung in ein beschriftetes 1,5 ml Eppi pipettieren, eventuell noch verdünnen mit DNA Hydration Solution, wenn zu dickflüssig; im Kühlschrank lagern
19. DNA-Konzentrationsmessung Konzentration < 35ng/µl muss wiederholt werden Verhältnis 260/280 muss zwischen 1,65 - 2,1 liegen (Einstellung auf 50 – 70 ng)

## A.8 Tabelle zur logistischen Regression klinischer Risikofaktoren der IVH

Tabelle 10: Logistische Regression der klinischen Risikofaktoren für eine schwere IVH

	Keine IVH, IVH Grad 1/2 (n = 7450)	IVH Grad 3/4 (n = 502)	Multivariates p	OR (95 % KI)
Gestationsalter* [Wochen]	28,3/ 2,2	26,1/ 2,0	< 0,001	0,75 (0,71 – 0,78)
Männliches Geschlecht [%]	51,9	61,2	0,016	1,27 (1,04 – 1,55)
Mehrling [%]	33,7	38,4	< 0,001	1,51 (1,24 – 1,85)
SGA [%]	11,7	10,2	0,006	0,64 (0,47 – 0,88)
Mutter deutscher Herkunft [%]	72,9	74,1	0,216	1,15 (0,92 – 1,43)
Keine antenatale Steroidgabe [%]	8,6	20,7	< 0,001	2,23 (1,73 – 2,87)
APGAR < 3 mit 5 min [%]	0,6	3,8	0,001	2,67 (1,49 – 4,81)
Tracheale Beatmung [%]	50,6	94,0	< 0,001	7,01 (4,74 – 10,38)
Pneumothorax [%]	4,7	14,9	< 0,001	2,06 (1,55 – 2,73)
Apo E3 [%]	64,3	56,0	Referenz	
Apo E2 [%]	11,4	14,9	0,049	1,33 (1,00 – 1,76)
Apo E4 [%]	23,7	29,1	0,003	1,39 (1,12 – 1,74)

\* Mittelwert/ Standardabweichung

# Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

In erster Linie bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Wolfgang Göpel für die persönliche und gute Betreuung. Seine Tür stand mir immer offen und meine zahlreichen Fragen beantwortete er stets mit viel Geduld und Gelassenheit. Außerdem zeigte er mir, mit welcher Begeisterungsfähigkeit man der Welt der Wissenschaft und Forschung begegnen kann und ich bin dankbar, einen Einblick in diese Welt bekommen zu haben.

Darüber hinaus möchte ich mich beim gesamten Team des Deutschen Frühgeborenen-Netzwerkes für die herzliche Aufnahme und die tolle Stimmung während meiner gesamten Zeit dort bedanken. Insbesondere an die zahlreichen gemeinsamen Stunden bei den 5-Jahres-Nachuntersuchungen mit Petra Sperner, Birgit Schröder, Liane Triebwasser und Jörg Olszewski denke ich gerne zurück. Des Weiteren danke ich Anja Graf, die mich mit der Laborarbeit vertraut gemacht hat. Mein Dank gilt zudem auch Bea Hatje und Irene Fischer, die mich stets mit netten Worten empfingen und mir bei sämtlichen organisatorischen Fragen weiterhalfen.

Abschließend möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mir stets zur Seite stehen und auf die ich mich immer verlassen kann.

Mein besonderer Dank gilt dabei Preema Mehta und Johannes Borgmann, die diese Arbeit Korrektur lasen und den ein oder anderen Fehler zu Tage brachten.

# Lebenslauf



## Persönliche Daten

---

Name	Schulz
Vorname	Sören
Geburtsdatum	16.05.1992
Geburtsort	Uelzen

## Hochschulstudium

---

7/2019 – 10/2019	PJ Tertiair Kinderchirurgie und allgemeine Chirurgie, <i>Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck</i>
3/2019 – 6/2019	PJ Tertiair Innere Medizin, <i>Kantonsspital Baden, Schweiz</i>
11/2018 – 3/2019	PJ Tertiair Pädiatrie, <i>Klinikum Dortmund</i>
4/2018 – 11/2018	Promotionssemester
4/2018	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: 2,0
8/2015 – 7/2018	Wissenschaftliche Hilfskraft, <i>Deutsches Frühgeborenen Netzwerk GNN,</i> <i>Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, UKSH, Lübeck</i>
8/2015 – 4/2016	Promotionssemester
9/2014	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: 2,0
Seit 10/2012	Studium der Humanmedizin, <i>Universität zu Lübeck</i>

## Famulaturen

---

9/2017	Famulatur, <i>Livingstonia memorial hospital, Malawi</i>
8/2017	Famulatur interdisziplinäre Notaufnahme, <i>Sana Kliniken Lübeck</i>
3/2017	Famulatur Allgemeinmedizinische Praxis, <i>Lübeck</i>
2/2017 – 3/2017	Famulatur Klinik für Pädiatrie, <i>Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck</i>
9/2016 – 10/2016	Famulatur IMC und Kardiologie, <i>Westküstenklinikum Heide</i>
8/2016	Famulatur Kinderärztliche Praxis, <i>Lübeck</i>
3/2016	Famulatur Poliklinik für Neurologie, <i>Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck</i>
8/2015	Famulatur Klinik für Radiologie, <i>Sana Kliniken Lübeck</i>
2/2015 – 3/2015	Famulatur Geriatrie, <i>Krankenhaus Rotes Kreuz Lübeck</i>

## Publikationen

---

- Dzietko M, Schulz S, Preuss M, Haertel C, Stein A, Felderhoff-Mueser U, Goepel W (2019): Apolipoprotein E gene polymorphisms and intraventricular haemorrhage in infants born preterm: a large prospective multicentre cohort study. *Dev Med Child Neurol* 61, 337–342
- Norda S, Rausch TK, Orlikowsky T, Hütten M, Schulz S, Göpel W, Pecks U (2017): Apolipoprotein E Genotype in Very Preterm Neonates with Intrauterine Growth Restriction: An Analysis of the German Neonatal Network Cohort. *BioMed Res Int* 2017, 2837027