

---

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

---

# Laktase-Persistenz und Frühgeburtlichkeit

Über die Auswirkungen des Laktase-Persistenz-Gens auf die kurz-  
und langfristige Entwicklung sehr kleiner Frühgeborener

Inauguraldissertation

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



vorgelegt von  
Lena Beyssell  
aus Hamburg

Lübeck 2020

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

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Lutz Fricke

Tag der mündlichen Prüfung: 08.12.2020

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 08.12.2020

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	FRÜHGEBURTlichkeit	1
1.2	LAKTASE-PERSISTENZ	3
1.3	SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM	6
1.4	FRÜHGEBURTlichkeit UND LAKTASE-PERSISTENZ	9
1.5	FRAGESTELLUNGEN	10
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>11</b>
2.1	STUDIE	11
2.1.1	Studienpopulation	11
2.1.2	Studiendurchführung	11
2.1.3	Studienablauf	12
2.2	MATERIALIEN	14
2.2.1	Arbeitsmaterial der genetischen Analyse	14
2.2.2	Arbeitsmaterial der Follow-Up Untersuchung	16
2.3	DNA-ISOLIERUNG, AMPLIFIZIERUNG UND GENOTYPISIERUNG	17
2.3.1	DNA-Isolierung aus Mundschleimhaut Gewebe	17
2.3.2	DNA-Isolierung aus Nabelschnur Gewebe	18
2.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	20
2.3.4	Allelische Diskriminierung	22
2.3.5	Auslesen und Auswertung	22
2.4	5-JAHRES-NACHUNTERSUCHUNGEN	23
2.4.1	Ablauf	23
2.4.2	Erhobene Parameter	23
2.4.3	Erhebung der Daten	23
2.5	STATISTIK	25
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>26</b>
3.1	STUDIENPOPULATION	26
3.1.1	Klinische Daten	28
3.1.2	Maternale Herkunft	29
3.1.3	Kindliche Herkunft	30
3.2	KOMPLIKATIONEN	31
3.3	WACHSTUM	34
3.3.1	Wachstum im Neugeborenen Alter	34
3.3.2	Wachstum im Alter von fünf Jahren	36
3.4	NEUROKOGNITIVE ENTWICKLUNG	37

<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>39</b>
4.1	INZIDENZ IM INTERNATIONALEN VERGLEICH.....	41
4.2	KLINISCHE DATEN UND KOMPLIKATIONEN.....	42
4.3	WACHSTUM.....	45
4.3.1	Kopfumfang.....	45
4.3.2	Körperlänge.....	46
4.3.3	Körpergewicht.....	47
4.4	NEUROKOGNITIVE ENTWICKLUNG.....	49
4.5	STÄRKEN UND LIMITATIONEN DER STUDIE.....	50
4.6	SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK.....	52
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>65</b>
7.1	LISTE DER KOOPERATIONSPARTNER DES GNN.....	65
7.2	EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG DER ELTERN.....	67
7.3	SUPPLEMENT TABELLE.....	68
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>69</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>70</b>

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Arbeitsmaterialien .....	14
Tabelle 2: Chemikalien.....	15
Tabelle 3: Arbeitsmaterialien der Follow-Up Untersuchung .....	16
Tabelle 4: PCR-Protokoll Reagenzien.....	20
Tabelle 5: PCR-Protokoll Ablauf .....	21
Tabelle 6: Perinatale Daten der Studienpopulation .....	28
Tabelle 7: Perinatale Daten der Population deutschen Ursprungs .....	30
Tabelle 8: Kurzfristige Komplikationen in Abhängigkeit von der Laktase-Persistenz.....	32
Tabelle 9: Körperlängenwachstum während des stationären Aufenthaltes.....	34
Tabelle 10: Zunahme des Körpergewichts während des stationären Aufenthaltes .....	35
Tabelle 11: Zunahme des Kopfumfanges während des stationären Aufenthaltes.....	35
Tabelle 12: Wachstumsdaten im Alter von 5 Jahren.....	36
Tabelle 13: Langfristige kognitive Entwicklung.....	38

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der Definitionen für Frühgeburtlichkeit.....	1
Abbildung 2: Laktoseverdau im menschlichen Körper.....	4
Abbildung 3: Karten der Verbreitung von LP und -13910*T Allel in der "alten Welt" .....	5
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Einzelbasen Polymorphismus (SNP) und des Insertions- und Deletionspolymorphismus .....	7
Abbildung 5: Karte der LCT und MCM6 Gen Region und Lokalisation des genotypisierten SNPs .....	8
Abbildung 6: DNA Isolierung aus Mundschleimhaut Gewebe.....	19
Abbildung 7: DNA Isolierung aus Nabelschnurgewebe .....	19
Abbildung 8: Studienpopulation.....	27
Abbildung 9: Laktase-Persistenz in Abhängigkeit von der mütterlichen Herkunft .....	29
Abbildung 10 Tendenz von polymorphen Varianten der LP weltweit.....	42

# Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BMI	Body Mass Index
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
CP	Cerebralparese
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELBW	Extremely low birth weight (extrem niedriges Geburtsgewicht, <1000g)
ER	Enhancer Region
FG	Frühgeborenes/Frühgeborene
FIP	Fokale intestinale Perforation
GA	Gestationsalter
GG	Geburtsgewicht
GMFCS	Gross Motor Function Classification System
GNN	German Neonatal Network, Deutsches Frühgeborenen-Netzwerk
IVH	Intraventrikuläre Hämorrhagie
KU	Kopfumfang
LBW	Low birth weight (niedriges Geburtsgewicht, <2500g)
Lak+	Individuen mit Laktase-Persistenz
Lak-	Individuen ohne Laktase-Persistenz
LCT	Gensymbol des Enzyms Laktase
LNP	Laktase-Nonpersistenz
LP	Laktase-Persistenz
LPG	Laktase-Persistenz-Gen
LPH	Lactase-Phlorizin-Hydrolase, kurz: Laktase
MCM6	Minichromosom Maintenance 6 Gen
n	(lat.: numerus) Anzahl

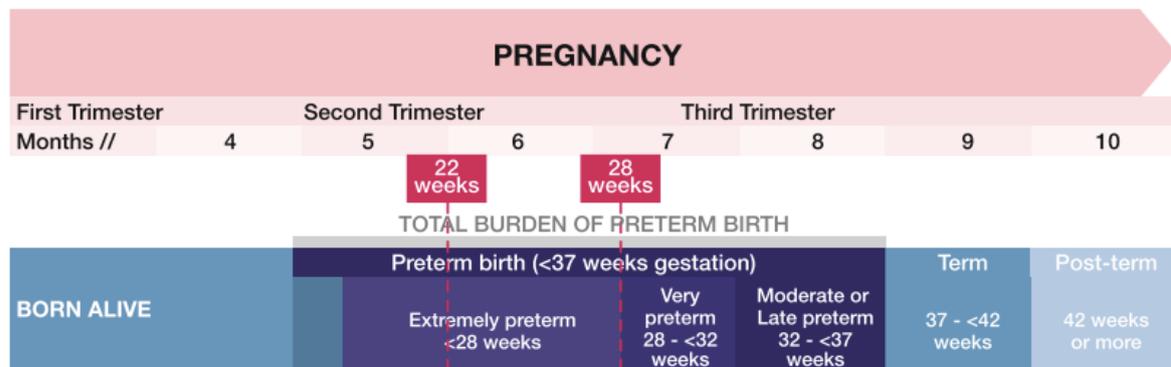
NEC	Nekrotisierende Enterocolitis
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PDA	Persistierender Ductus Arteriosus Botalli
PVL	Periventriculäre Leukomalazie
ROP	Retinopathy of prematurity
SD	Standardabweichung (engl. standard deviation)
SGA	Small for gestational age
SNP	Single Nukleotid Polymorphismus
SSW	Schwangerschaftswoche/-n
Tab.	Tabelle
VLBW	Very low birth weight (sehr niedriges Geburtsgewicht, <1500g)

# 1 Einleitung

## 1.1 Frühgeburtlichkeit

Über 1 von 10 Neugeborenen wurde 2010 weltweit zu früh geboren, somit waren etwa 15 Millionen Kinder Frühgeborene. Mehr als 1 Millionen Kinder starben an den Folgen ihrer Frühgeburtlichkeit [1,2]. Sie sind für etwa *ein Drittel aller neonatalen Todesfälle* verantwortlich [3]. In den westlichen entwickelten Nationen stieg in den letzten zwei Jahrzehnten die Rate an Frühgeburten stetig an. [4]

Als Frühgeburt gilt die Geburt vor der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche (SSW) post menstruationem. Innerhalb des Patientenkollektivs der Frühgeborenen existieren weitere Unterteilungen zur besseren Prognosebestimmung. Anhand des Gestationsalters (GA) lassen sich die Kinder einteilen in frühgeboren (<37. SSW), sehr frühgeboren (<32. SSW) und extrem frühgeboren (<28. SSW).



**Abbildung 1: Übersicht der Definitionen für Frühgeburtlichkeit**  
 modifiziert nach Howson et al. [74]

Richtet man sich hingegen nach dem Geburtsgewicht (GG), so unterscheidet man untergewichtige Frühgeborene mit einem GG <2500g (low birth weight, LBW), sehr untergewichtige (very low birth weight, VLBW) <1500 g sowie extrem untergewichtige Frühgeborene (extremely low birth weight, ELBW) <1000 g. Von dieser Einteilung abzugrenzen ist die Gruppe der Kinder, die als zu klein für ihr GA klassifiziert werden, bezeichnet als „small for gestational age“ (SGA). Dies sind Feten oder Neugeborene, die ein Schätz- oder Geburtsgewicht unterhalb der 10. Perzentile haben [5]. Dieser Terminus

kann sowohl auf früh- als auch auf reifgeborene Säuglinge angewendet werden. Die Einteilung erfolgt anhand aktueller deutscher Perzentilenkurven [6].

Die Ursachen für die wachsende Zahl Frühgeborener sind vielfältig. Die Raten an *künstlicher Befruchtung bei älteren Gebärenden* nehmen zu. Diese Schwangerschaften führen bereits zu höheren Raten an Frühgeburtlichkeit. Zudem führen sie wiederum zu einer erhöhten Inzidenz an *Mehrlingsschwangerschaften*. Diese haben mit Frühgeburtlichkeitsraten von 40-60% im Vgl. zu 5-10% bei Einlingsschwangerschaften ein deutlich höheres Risiko für eine verfrühte Geburt. An *Volkskrankheiten* wie Adipositas, Bluthochdruck und Diabetes mellitus erkranken immer häufiger auch Frauen in geburtsfähigem Alter. Damit einhergehende *Schwangerschaftskomplikationen* mit dem erhöhten Risiko einer Frühgeburt treten daher häufiger auf [1].

Die Überlebensrate sehr kleiner Frühgeborener stieg in den letzten 30 Jahren auf Grund verbesserter perinataler Versorgung stetig. Frühgeborene haben postnatal ein hohes Risiko für kurzfristigen Komplikationen, hierzu zählen u.a. *Hirnblutungen, pulmonale und abdominelle Komplikationen* (nekrotisierende Enterocolitis, fokale intestinale Perforation) [7–10]. Neue Therapiemöglichkeiten beispielsweise mit Kortikosteroiden und Surfactant revolutionierten die Neonatalmedizin, sodass sich zunächst die kurzfristigen Prognosen für sehr kleine Frühgeborene stetig besserten. Der Frühgeborenen Studie EPIPAGE 2 aus Frankreich zufolge stiegen die Überlebensraten für sehr frühgeborene Kinder seit 1997 um 14% signifikant an und auch im Deutschen Frühgeborenen Netzwerk (GNN) steigt die Überlebensrate [11,12]. Auf die steigende Überlebensrate Frühgeborener folgt eine Weiterentwicklung von Therapieansätzen, die zur verbesserten Langzeitentwicklung dieses Patientenkollektivs beitragen [13]. Langfristig haben die Kinder u.a. ein erhöhtes Risiko für ein *reduziertes Körperwachstum* und eine *unterdurchschnittliche neurokognitive Entwicklung* [14]. Die langfristigen Folgen betreffen insbesondere sehr frühgeborene Menschen [15].

Bei wachsender Anzahl inzwischen adulter Frühgeborener wird zunehmend ein stärkerer Fokus auf die Folgeschäden der Frühgeburtlichkeit gelegt, da sie zu lebenslanger Morbidität führen kann [16].

Auch der finanzielle Aspekt der Neonatologie im Gesundheitswesen ist ein relevanter Faktor. Es liegen Studien aus Skandinavien und den USA vor, die jeweils auf die

erheblichen Mehrkosten der Frühgeburtlichkeit für die Gesellschaft hinweisen [17–19]. Die finanziellen *Mehrkosten* eines zu früh geborenen im Vgl. zu einem reif geborenen Kind liegen Schätzungen einer Studie der Charité zufolge in Deutschland bei mindestens 10.000 € [20].

All dies verdeutlicht die Dringlichkeit, die moralische, finanzielle und ethische Relevanz der Forschung im Hinblick auf Frühgeburtlichkeit.

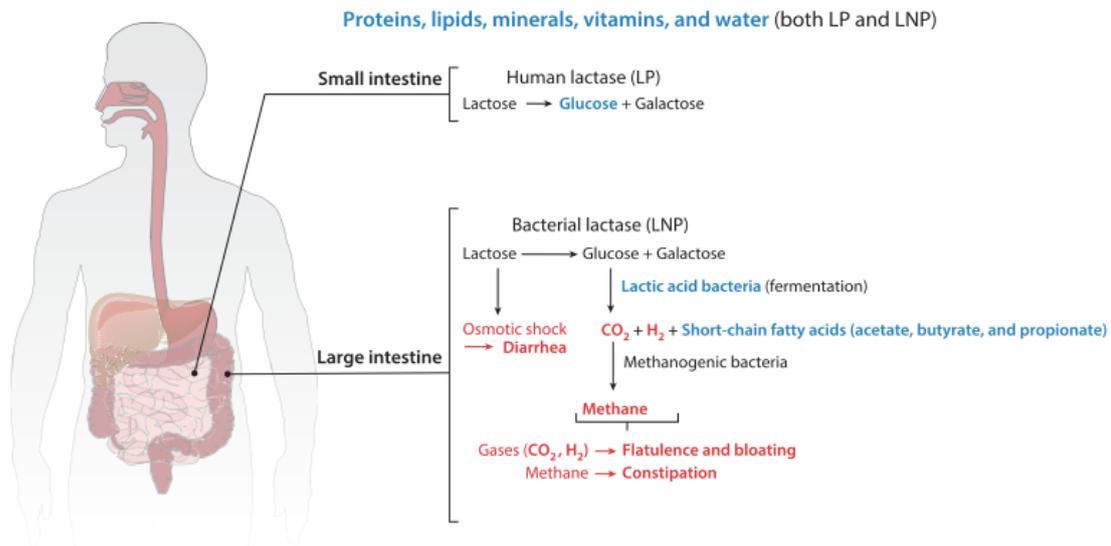
Die Identifizierung möglicher Einfluss- und Risikofaktoren im Leben der Frühgeborenen ist der erste Schritt zur langfristigen Verbesserung der Versorgung. Sie dienen der Prävention möglicher Komplikationen, der Entwicklung neuer Behandlungsstrategien sowie als Grundlage für zukünftige Forschung. Relevant sind die *medizinische Versorgung* und das *Umfeld* in den ersten Lebenswochen, das Auftreten von *Komplikationen* aber auch die *Ernährung*. Hierbei spielt insbesondere die Ernährung mit Muttermilch eine zentrale Rolle.

## 1.2 Laktase-Persistenz

Milch dient seit Millionen von Jahren der frühen Ernährung der Nachkommen von Säugetieren [21]. Die Fähigkeit zur Laktation, der Milchproduktion, durch Säugetiere geht möglicherweise schon auf das Pennsylvanische Zeitalter vor etwa 310 Millionen Jahren zurück [22]. Milch eignet sich auf Grund ihrer Zusammensetzung aus reichhaltigen Nährstoffen und bioaktiven Faktoren mit 65-70 kcal/dL hervorragend als Hauptenergiequelle für das Überleben und die gesunde Entwicklung von neugeborenen Säugetieren. Unter anderem wird eine verbesserte neurokognitive Entwicklung im Rahmen der Muttermilch Ernährung beschrieben [23].

Milch besteht aus *Proteinen, Fetten und Kohlenhydraten*. Die Kohlenhydrate bestehen größtenteils aus Laktose und Oligosacchariden. Das Dissaccharid Milchzucker, die Laktose, macht mit 6,7 bis 7,8 g/dL Muttermilch den größten Teil der Makronährstoffe und ca. 40% der Kalorien der Muttermilch aus [21,24]. Zur Spaltung in die Monosaccharide Glukose und Galaktose sowie den anschließenden Verdau ist das im Dünndarm gebildete Enzym Laktase (auch *Lactase-Phlorizin-Hydrolase, LPH*) essentiell. Bei fehlender oder eingeschränkter Aktivität dieses Enzyms kann es in Folge von Milchkonsum zu *gastrointestinalen Beschwerden* mit abdominellen Schmerzen, Flatulenz und Diarrhoen

kommen [25]. Die Ausprägung der Symptomatik ist zudem abhängig von der Menge der zugeführten Laktose sowie von der Zusammensetzung des enteralen Mikrobioms. [26]



**Abbildung 2: Laktoseverdauung im menschlichen Körper**

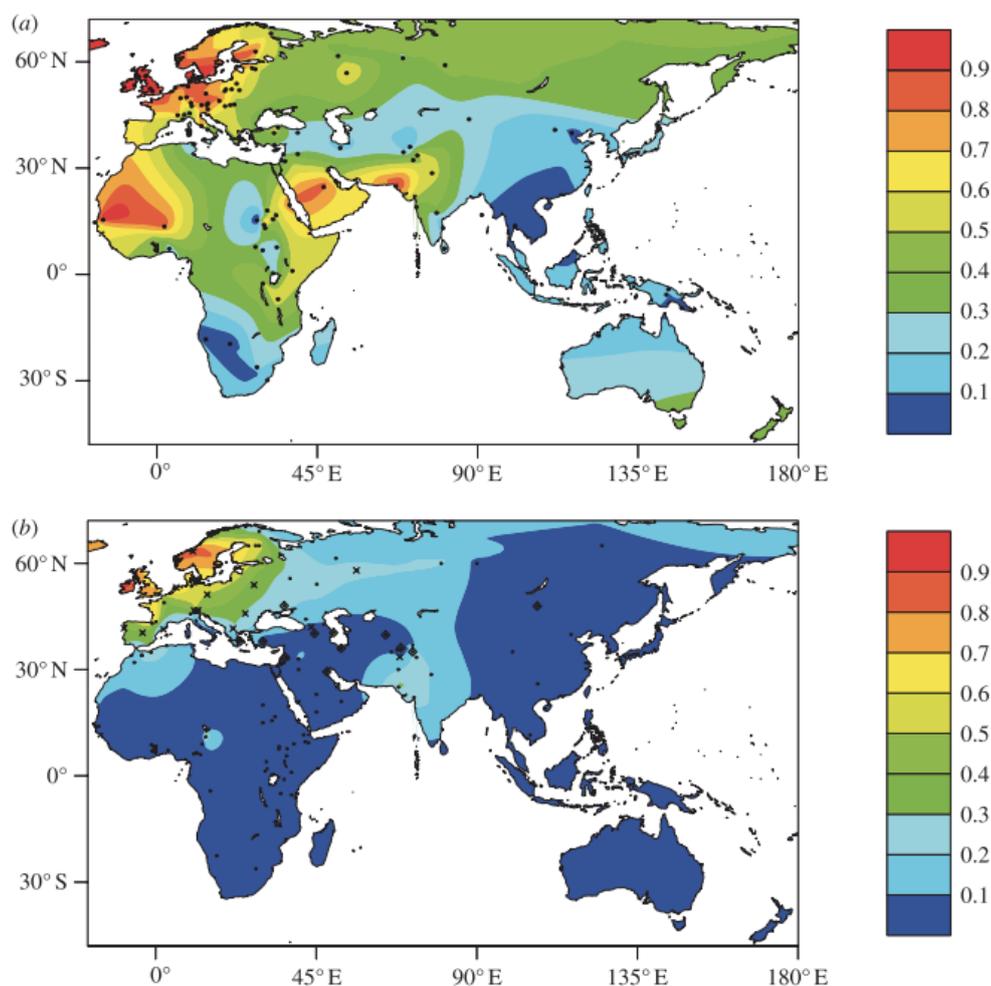
Modifiziert nach Segurel [27]

durch menschliche Laktase im Dünndarm (Lak+) oder bakterielle Laktase im Dickdarm (Lak-). Blau: Stoffwechselprodukte der Milch (Lak+/-), Rot: potentiell schädliche Produkte und Symptome bei Lak-.

Säugetiere besitzen nach der Geburt und während der gesamten Stillzeit eine hohe LPH Aktivität. Säuglinge und Kinder können etwa bis zum 5. Lebensjahr Laktose verwerten. Der zeitliche Beginn der Unverträglichkeit ist jedoch variabel und liegt je nach Herkunft und Ausmaß des Milchkonsums zwischen 2 und 10 Lebensjahren [28–33]. Der ausgeprägte Konsum von Milcherzeugnissen über dieses Alter hinaus scheint zu einem verzögerten Eintritt der Unverträglichkeit zu führen [34]. Die LPH Aktivität nimmt ernährungsphysiologisch mit zunehmendem Alter ab und führt bei ca. 65% der menschlichen Weltbevölkerung zu Laktoseintoleranz im Erwachsenenalter [35].

Bereits 1988 beschrieben Scrimshaw und Murray jedoch das Phänomen, dass bei einzelnen Individuen europäischer Abstammung die LPH bis in das Erwachsenenalter persistiert. [36] Bei diesem Phänomen, der so genannten Laktase-Persistenz (LP), handelt es sich um eine *autosomal dominant vererbte genetische Eigenschaft*, die die *fortlaufende Expression des LPH* und somit die Fähigkeit zur Spaltung von Laktose zur Folge hat. Individuen mit LP (Lak+) können im Gegenteil zu Individuen ohne LP (Lak-) somit *über das Kindesalter hinaus Milchzucker verdauen* [37,38].

Die Studiengruppe um Enattah berichtete, dass die Variation ihren *Ursprung in der jüngeren Evolution* hat und ihre Ausbreitung durch eine ausgeprägte positive natürliche Selektion begründet ist [33,39]. Burger et al berichteten 2007 von einer sehr niedrigen Frequenz der LP im frühen Neolithikum. Das Neolithikum (*Syn. Jungsteinzeit*, ca. 5500 bis 2200 v. Chr.) ist eine Epoche, die in Mittel- und Westeuropa mit dem *Übergang von Jäger- und Sammlerkulturen zu sesshaften Bauern* begann. Dieser veränderte Lebensstil und die neolithische Wirtschaftsweise mit *domestizierten Tieren* und Pflanzen führte zu einem über die Stillzeit hinausgehenden Milchkonsum [40]. Mutmaßlich führte diese *Erweiterung der Lebensmittelressourcen* zu einem *Überlebensvorteil* insbesondere in Zeiten von Nahrungsmangel [38,41,42]. Die Studiengruppe um Krüttli fand eine hohe Frequenz an LP im darauffolgenden Mittelalter [43]. Es ist somit davon auszugehen, dass der Polymorphismus erstmals im Neolithikum auftrat und sich anschließend rasch ausbreitete, sodass im Mittelalter bereits eine hohe Genfrequenz nachweisbar ist.



**Abbildung 3: Karten der Verbreitung von LP und -13910\*T Allel in der "alten Welt"**

*Modifiziert nach Gerbault et al. [31]*

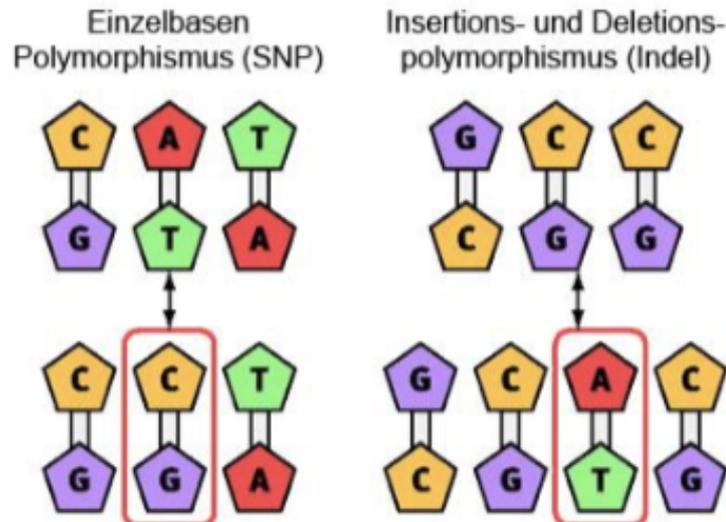
(a) Verbreitung des LP Phänotyps (b) Verbreitung des -13910\*T Allels, assoziiert mit LP

In späteren Studien konnte dann bewiesen werden, dass LP weltweit nicht ausschließlich auf diesen einzelnen Polymorphismus zurückzuführen ist. Tishkoff et al. untersuchten 2009 die Eigenschaft der LP in afrikanischen Bevölkerungen und konnten drei weitere Polymorphismen identifizieren, die in afrikanischen Populationen häufiger als der bisher identifizierte Polymorphismus -13910\*T nachweisbar waren [44–46]. Diese Polymorphismen liegen an einer leicht veränderten Position desselben Chromosoms, es handelt sich mutmaßlich um eine zeitlich konvergente Entwicklung.

Lange war es nicht möglich, Lak+/Lak+ Individuen sicher zu differenzieren, da die Invasivität intestinaler Biopsien eine Durchführung zu Studienzwecken nicht rechtfertigt. In den vergangenen Jahrzehnten wurde daher auf so genannte Laktose-Toleranz-Tests zurückgegriffen, die entweder den Anstieg des Blutzuckers oder die expirative Ausscheidung von H<sup>+</sup> Ionen nach Glukoseverzehr messen [47]. Mit dieser Methode konnte jedoch nur eine diätische Intoleranz, nicht hingegen die tatsächliche Expression des LPH nachgewiesen werden. Zudem sind diese indirekten Methoden abhängig von unterschiedlichen Faktoren, wie beispielsweise dem individuellen Glukose Metabolismus oder der körperlichen Aktivität. Auch führen Infektionen oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gehäuft zu falsch negativen oder positiven Ergebnissen. Indirekte diagnostische Methoden können daher *unzureichend verlässlich* sein und *nicht mit klinischen Symptomen korrelieren* [48,49]. Die Forschung zur genetischen Ursache und eindeutigen Identifizierung Lak+ Individuen intensivierte sich erst im Laufe der letzten Jahrzehnte. Der endgültige Durchbruch gelang mit der Identifizierung der so genannten Einzelbasenpolymorphismen.

### 1.3 Single nucleotide polymorphism

Das menschliche Genom ist reich an Variationen und weist durchschnittlich etwa alle 1000 Basenpaare eine Variation auf. Einzelbasenpolymorphismen (engl. single nucleotide polymorphism, SNP) repräsentieren die häufigste Form genetischer Variationen. Sie sind für einen Großteil der vererbaren phänotypischen Unterschiede verantwortlich. Es handelt sich um *genetische Variationen an bekannten DNA Loci*. Ursprünglich handelte es sich um Punktmutationen, die im Laufe der Evolution innerhalb von Populationen persistierten. Einzelne Basenpaare weisen eine interindividuelle Varianz auf. Es treten alternierend zwei verschiedene Basen auf [50].



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Einzelbasen Polymorphismus (SNP) und des Insertions- und Deletionspolymorphismus**

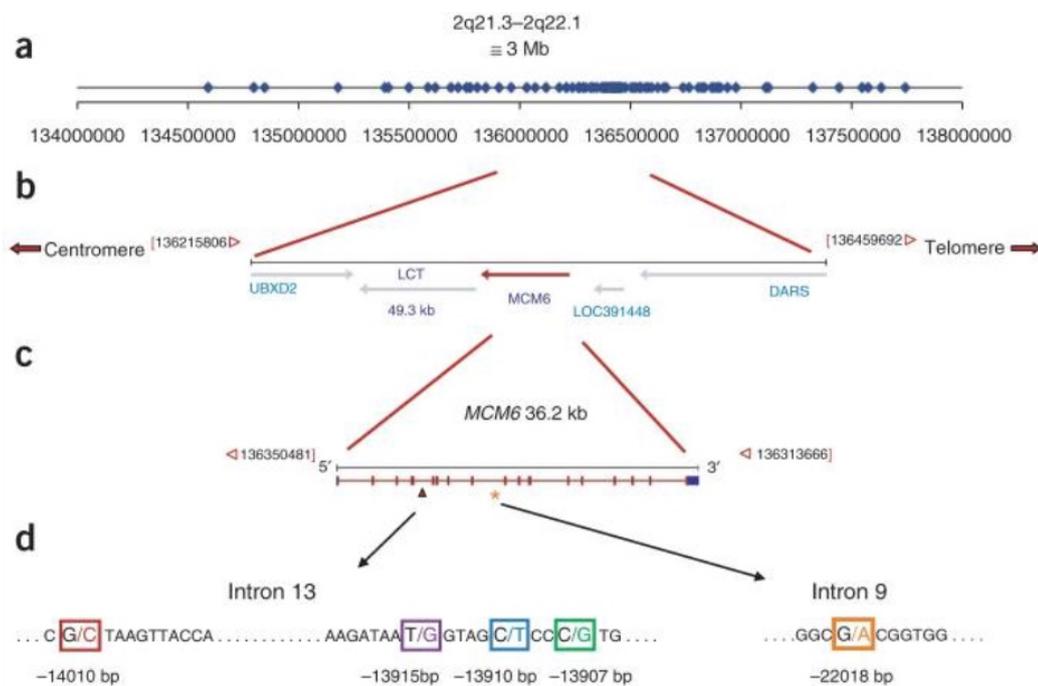
*Modifiziert nach Hingorani et al. [124]*

Mindestens 90% der Variationen in der menschlichen DNA werden durch SNPs verursacht [51]. Im Gegensatz zu Mutationen folgen sie den Erbgängen und treten mit einer höheren Allelfrequenz auf. Definitionsgemäß werden Variationen, die bei mehr als 1% der Population auftreten, als SNP bezeichnet. Die Frequenz ist abhängig von unterschiedlichen Faktoren, unter anderem von dem *evolutionsbiologischen Selektionsdruck* und von dem *Zeitpunkt*, zu dem die Mutation erstmalig auftrat [52].

Die Identifizierung tausender Polymorphismen hat in den letzten Jahren zu vielfältigen Forschungserfolgen in der Medizin geführt. Die Identifizierung von SNP zur präziseren Kategorisierung der *Schizophrenie*, der *akuten lymphatischen Leukämie* und zur Therapie der *Hepatitis C* sind nur einige insgesamt vieler Fortschritte, die diese Untersuchungsmethode in den letzten Jahren ermöglichte [53]. Die Anwendung dieser Technik beschränkt sich jedoch nicht nur auf die klinische Medizin. Sie hat in vielen Fachbereichen wie beispielsweise in der Pharmakogenetik, in der Botanik und in der forensischen Genetik ihre Anwendung gefunden [54] und sich weltweit als eine gängige molekular-zytogenetische Methode etabliert.

Die Technik erlangte auch für die LP an Bedeutung. Bereits in den 1980er Jahren begannen Wissenschaftler, sich mit einer möglichen genetischen Variation zu beschäftigen, der das Phänomen der Laktase-Persistenz zugrunde liegen könnte. Zunächst

existierte die Hypothese, dass ein Polymorphismus im Gen der LPH für LP verantwortlich ist. Diese Theorie wurde nach jahrelanger Forschung Ende der 1980er Jahre falsifiziert. Es konnte keine DNA Variation innerhalb des Laktase Gens nachgewiesen werden, die das Phänomen der LP hinreichend erklärte [55,56]. In den frühen zweitausender Jahren wurde dann eine Enhancer Region (ER) für das Laktase Gen entdeckt [28,38]. ER sind Regionen auf Chromosomen, die Einfluss auf Genprodukte entfernt gelegener Chromosomenregionen haben [57–59]. Eine Studiengruppe um Bersaglieri führte eine genetische Typisierung von 360 Individuen durch. Sie konnte nachweisen, dass eine *Punktmutation auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 zum Austausch einer Cytosin- durch ein Tyrosin-Base (C->T -13.910\*T)* führt. Die Mutation ist unterhalb des Laktasegens (LCT) auf Intron 13 des „Minichromosome Maintenance 6“ Gen (MCM 6) lokalisiert und korreliert klinisch mit der Laktose Verträglichkeit. Das *T Allel* – auftretend beim heterozygoten Genotyp CT sowie dem homozygoten Genotyp TT- *korreliert mit der Persistenz (Lak+)*. Der homozygote CC Genotyp ist mit vollständiger Nonpersistenz der Laktase assoziiert (Lak-). Das Laktase-Persistenz-Gen (LPG) war identifiziert und wurde als SNP „rs4988235“ am 27.01.2016 in die GWAS Datenbank aufgenommen.



**Abbildung 5: Karte der LCT und MCM6 Gen Region und Lokalisation des genotypisierten SNPs**

*Modifiziert nach Tishkoff et al. [60]*

(a) Verteilung der in die Genotyp Analyse involvierten 123 SNPs (b) Karte der LCT und MCM 6 Gen Region (c) Karte des MCM6 Gens (d) Lokalisation der LP-assoziierten SNPs innerhalb der Introns 9 und 13 des MCM6 Gens in afrikanischen und europäischen Populationen.

Erstmals Erwähnung in der Literatur fand der Polymorphismus 2002 als Genvariante im Zusammenhang mit Laktosemaldigestion [38]. Seither handelt es sich um einen der am häufigsten untersuchten SNP weltweit. In zahlreichen Studien konnte beispielsweise der Einfluss des LPG auf Gewicht und Blutdruck bei Erwachsenen nachgewiesen werden [61]. Auch wurde bereits eruiert, dass Personen mit LP eine veränderte Darmflora (Mikrobiom) mit einer hohen Rate an Bifidusbakterien haben [62]. Es konnte nachgewiesen werden, dass LP Individuen einen höheren Milchkonsum haben, es sich somit um einen Prädiktor für genetisch determiniert erhöhten Milchkonsum handelt [63]. Erste retrospektive Studien legen einen Zusammenhang zwischen *Milchkonsum und Gewicht sowie Blutdruck auch in pädiatrischen Studienpopulationen* nahe [64].

Mit der Identifizierung eines individuellen genetischen Risikoprofils eröffnet sich in Zukunft ein großes Spektrum neuer Möglichkeiten in der Medizin. Interindividuelle Unterschiede bei Therapieansprechen und Outcome können antizipiert und im Sinne des Patienten genutzt werden [65]. Präventions- und Interventionsstrategien können angepasst werden, eine individualisierte diätetische oder pharmakologische Therapie wird ermöglicht. Auch kann dieses Wissen für die Sekundärprävention möglicher Folgeerkrankungen genutzt werden.

## **1.4 Frühgeburtlichkeit und Laktase-Persistenz**

Die steigende Rate an Frühgeburtlichkeit, das moralische und ethische Streben aber auch der finanzielle Druck in der Gesundheitsversorgung verdeutlichen den Bedarf an intensiver Forschung. Eine individuelle und hoch professionalisierte Therapie in der Neonatologie ist heutzutage dringlicher denn je. Trotz der umfangreichen Forschung und des Wissens um die klinisch interessante genetische Variante rs4988235 liegen bisher wenige Studien an pädiatrischen Studienpopulationen vor. Insbesondere untersuchte bisher niemand den Einfluss auf die Entwicklung Frühgeborener. Dieser Assoziation widmete sich diese Studie.

LP Individuen haben bekanntermaßen einen hohen Anteil an Bifidusbakterien im enteralen Mikrobiom, die Gabe von Bifidusbakterien führte in einigen Frühgeborenen Studien zudem zu einer niedrigeren Rate abdomineller Komplikationen [66]. Es interessierte uns daher die Rate an abdominellen Operationen bei Frühgeborenen in Abhängigkeit vom LP-Status. Aufgrund der beschriebenen evolutionären Daten und dem hohen Risiko von Frühgeborenen für Störungen des Wachstums und der Entwicklung interessierte uns zudem die Frage, ob Frühgeborene mit LP einen Vorteil in Bezug auf diese Endpunkte haben. Muttermilchernährung wird mit einer besseren neurokognitiven Entwicklung Neugeborener assoziiert. Daher widmeten wir uns in der vorliegenden Arbeit dieser Entwicklung sowie dem Körpergewicht als Parameter für die langfristige Entwicklung der Frühgeborenen.

## **1.5 Fragestellungen**

1. Haben Frühgeborene mit Laktase-Persistenz eine niedrigere Rate an abdominellen Operationen auf Grund einer nekrotisierenden Enterocolitis und/oder einer fokalen intestinalen Perforation? Führt die Laktase-Persistenz in diesem Zusammenhang zu einer niedrigeren Mortalität?
2. Bietet die Laktase-Persistenz Frühgeborenen einen Vorteil bezüglich ihres Wachstums bis zum Alter von fünf Jahren?
3. Hat die Laktase-Persistenz einen Einfluss auf die neurokognitive Entwicklung im Kleinkindalter?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Studie**

Diese Arbeit verwendet Daten und verarbeitet genetisches Material aus der deutschlandweiten Frühgeborenen-Studie (German Neonatal Network = GNN) mit Studiensitz in Lübeck. Es handelt sich um eine multizentrische prospektive Kohortenstudie, welche die kurz- und langfristige körperliche und neurologische Entwicklung von Frühgeborenen mit einem GG <1500g beobachtet und nachuntersucht. Ziel der Studie ist die Verbesserung der langfristigen Entwicklung dieser Patientengruppe durch Identifikation möglicher genetischer, sozialer und klinischer Einflussfaktoren. Das Wissen um diese Faktoren kann genutzt werden, um Kinder mit besonderen Risiken frühzeitig zu identifizieren, bei Bedarf zu behandeln und somit deren Prognose zu verbessern.

#### **2.1.1 Studienpopulation**

In die Studie eingeschlossen werden sehr kleine Frühgeborene (VLBW) mit einem GG <1500g und entbunden vor der vollendeten 37. SSW (SSW <36+6), die seit 01.01.2009 in einem der 54 deutschlandweit teilnehmenden Perinatalzentren geboren wurden. (Liste aller teilnehmenden Kliniken s. Anhang) Letale Fehlbildungen, eine fehlende Einverständniserklärung der Eltern sowie die Verlegung des Kindes aus einem anderen Klinikum in eine teilnehmende Klinik schließen die Teilnahme an der Studie aus. In dieser Arbeit ausgewertet wurden die Daten aller Studienteilnehmer, die bis zum 31.12.2015 aus der stationären Erstversorgung entlassen wurden.

#### **2.1.2 Studiendurchführung**

Deutschlandweit nahmen zwischen 2009 und 2015 54 Kliniken mit neonatologischer Intensivversorgung (mind. 40 FG <1500g pro Jahr) an der GNN Studie mit Studiensitz in Lübeck teil.

### 2.1.3 Studienablauf

Die Studie gliedert sich in mehrere Schritte. In den Geburtskliniken erheben lokale Ärzte auf standardisierten Dokumentationsbögen postnatal und nach Entlassung Daten und gewinnen biologisches Material. Bis zum 5. Lebensjahr erhalten die Eltern jährlich einen Fragebogen zur aktuellen Entwicklung ihres Kindes. Im Alter von 5 bis 6 Jahren wird ein Teil der Studienpopulation in einer Follow-Up Untersuchung systematisch nachuntersucht. Diese Kinder werden durch das Zufallsprinzip ausgewählt. Mit dieser Nachuntersuchung ist die Studienteilnahme für die Kinder beendet.

#### 2.1.3.1 Datenerhebung und Probensammlung im GNN

Von allen am GNN teilnehmenden Kindern werden während des stationären Aufenthaltes systematisch umfangreiche klinische Datensätze erhoben sowie biologisches Material asserviert. Erfüllt ein Kind die Einschlusskriterien und soll es in die Studie aufgenommen werden, so erfolgt die mündliche und schriftliche Aufklärung der Eltern über die Studie und eine Einverständniserklärung wird eingeholt (siehe Anhang S. 67). Durch den behandelnden Arzt wird der erste von drei Datenerhebungsbögen 1/3 ausgefüllt, der antenatale und präklinische Daten von Mutter und Kind (u.a. Geburtsursache, -modus, Vorerkrankungen der Mutter, fetales Wachstum u.v.m.) erhebt.

Für die Biobank werden je zwei Mundschleimhautabstriche von Mutter und Kind angefertigt, bei mehr als 70% der teilnehmenden Kinder kann zusätzlich direkt nach der Geburt Nabelschnurgewebe asserviert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren werden, aus dem zu einem späteren Zeitpunkt DNA von hoher Qualität isoliert werden kann.

Das biologische Material, der erste Datenerhebungsbogen und die Einverständniserklärung werden zum frühestmöglichen Zeitpunkt an die Studienzentrale gesendet.

Die Datenerhebungsbögen 2 und 3 werden nach Entlassung, Verlegung oder Versterben des Kindes von dem behandelnden Arzt ausgefüllt und an die Studienzentrale retourniert. Diese beiden Bögen dokumentieren den stationären Verlauf inkl. medikamentöser Therapie, operativer Eingriffe, stationärer Eingriffe sowie Nahrungsaufbau. Sollte das Kind im Verlauf in eine andere Klinik verlegt werden, ist ein vierter Bogen von einem Arzt der Klinik auszufüllen, in die das Kind verlegt wurde. Für die Studie liegt ein positives Votum der Ethikkommissionen aller teilnehmenden Kliniken vor. (Ethikvotum Universität zu Lübeck vom 27.06.2008, Aktenzeichen 08-022)

### **2.1.3.2 Validität der Daten**

Die Eingabe aller im Rahmen der Studie erhobenen Daten erfolgt doppelt kontrolliert in eine Access-Datenbank in der Studienzentrale. Durch Mitarbeiter der Studienzentrale erfolgte im Rahmen eines Monitorings in jährlichen Abständen eine Datenkontrolle der erhobenen Parameter in den Kliniken vor Ort. Dieses Verfahren dient der Qualitätssicherung der Studie durch Überprüfung der Genauigkeit bestehender sowie einer Vervollständigung fehlender Daten.

## 2.2 Materialien

### 2.2.1 Arbeitsmaterial der genetischen Analyse

Tabelle 1: Arbeitsmaterialien

Produkt	Hersteller
Xplorer® 8-Kanal-Pipette 0,5-10 µl	Eppendorf
Reference® Einkanal-Pipette 1-10 µL	Eppendorf
Research® Einkanal-Pipette 10-100 µL	Eppendorf
Reference® Einkanal-Pipette 100-1000 µL	Eppendorf
Multipette stream®	Eppendorf
Combitips advanced® 0,1 mL	Eppendorf
Serological Pipette 25 mL	Sarstedt
Biosphere® Filter Tip 100 µl	Sarstedt
Biosphere® Tip 1000 µl	Sarstedt
pipetus®-akku Pipettierhilfe	Hirschmann-Laborgeräte
Röhre 5 mL	Sarstedt
Tube 5 mL	Sarstedt
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific
MicroAmp Adhesive Film Applicator	Thermo Fisher Scientific
SRotana 46 RSC	Hettich Zentrifugen
Titramax 100 T	Heidolph Instruments
Veriti 384 Well Thermal Cycler	Thermo Fisher Scientific
MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler	MJ Research
7900 HT Fast Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific
Auswertungssoftware SDS 2.4	Applied Biosystems
Kühlschrank 4°	Bosch
Kühlschrank -20°	Liebherr
MegaBlock® 96 Well	Sarstedt
384 PCR-Platte Vollrand	Sarstedt
384 Well-Platten Unterlage	Sarstedt

**(Tabelle 1: Arbeitsmaterial)**

Produkt	Hersteller
Conventional Disposable Sterile Scalpel	Feather
Peha® Einmalpinzetten	Paul Hartmann
Petrischalen steril	Sarstedt
Klebefolie optisch klar	Sarstedt

**Tabelle 2: Chemikalien**

Produkt	Hersteller
Aqua dest. Ampuwa® 10 ml	Fresenius kabi
TaqMan® Genotyping Master Mix	ThermoFisher
TaqMan® SNP Genotyping Assays rs4988235 625 µL 40x	Applied Biosystems (USA)
Eis	
Gentra Puregene Tissue Kit	Qiagen
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cell Lysis Solution</li> <li>• Puregene Proteinase K</li> <li>• RNase A Solution</li> <li>• Protein Precipitation Solution</li> <li>• DNA Hydration Solution</li> </ul>	
QIAamp DNA mini Kit	Qiagen
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Phosphate Puffered Saline (PBS)</li> <li>• AL-Puffer</li> <li>• Protease</li> <li>• Waschpuffer (AW1 und AW2)</li> <li>• AE-Puffer</li> </ul>	Gibco
Protein Precipitation Solution Kit 350 mL	Qiagen
Isopropanol	Carl Roth
Ethanol (absolut/96-100%)	Carl Roth

## 2.2.2 Arbeitsmaterial der Follow-Up Untersuchung

**Tabelle 3: Arbeitsmaterialien der Follow-Up Untersuchung**

Produkt	Hersteller
Messband DKSH plastic tape Nr. 111, Genauigkeit 1mm	DKSH
Messlatte Harpenden portable stadiometer	Holtain
Personenwaage mit Kabeldisplay M300020	ADE
Blutdruckmessgerät & Vital Signs Monitor VS-900	Mindray Medical GmbH
NIBP Manschette 10-19cm	Mindray Medical GmbH
Mindray SPO2	Mindray Medical GmbH
WPPSI-III Protokollbogen 4-7 und Aufgabenhefte	Pearson Assessment & Information GmbH, Frankfurt/M.
Movement Assessment Battery for Children	Pearson Assessment

## 2.3 DNA-Isolierung, Amplifizierung und Genotypisierung

Zur Genotypisierung musste die DNA aus den in die Studienzentrale gesendeten Mundschleimhautabstrichen und Nabelschnurresten initial isoliert werden um in einem nächsten Schritt DNA-Fragmente amplifizieren und schlussendlich sequenzieren zu können. Bis zur Weiterverarbeitung wurde die isolierte DNA bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 2.3.1 DNA-Isolierung aus Mundschleimhaut Gewebe

Die Isolierung der genomischen DNA aus den kindlichen Mundschleimhautabstrichen erfolgte mit dem Kit „QIAamp 96 DNA Blood“ des Herstellers Qiagen laut Herstellerprotokoll. Das Zellmaterial wurde lysiert, die freigesetzte DNA an ein Adsorbens gebunden, Zellreste und Kontaminationen ausgewaschen und die reine DNA in einem letzten Schritt eluiert. Der laborchemische Terminus Elution bezeichnet das Loslösen der isolierten DNA von dem Adsorbens.

Die in Eppendorf-Reaktionsgefäße (*Eppendorf*) gebrochenen Abstrichtupfer wurden mit einer Pufferlösung zur Reinigung (*PBS*), einem Lyse Puffer sowie einer Proteinase zum Aufbruch der Zellen versetzt, durch umgehendes Vortexen gemischt und anschließend im Thermoschüttler inkubiert. Um optimale Bedingungen für die anschließende Bindung an die Silicagel-Membran zu schaffen, wurde dem Lysat ein Volumen Ethanol (96-100%) hinzugefügt. Im nächsten Schritt wurde die extrahierte DNA durch Adsorption an die Silica-Membran der *QIAamp-Säulen* gebunden. Hierfür wurde das Reaktionsgemisch auf die *Qia Amp Plate* geladen, mit Folie verschlossen und zentrifugiert. Die anschließende Aufreinigung der Probe erfolgte in 2 Waschschrinen mit verschiedenen Puffern. Durch Zugabe des Elutions-Puffers (*AE-Puffer*) und anschließender Zentrifugation wurde die DNA von der Membran eluiert, sodass sie sich nun in der Platte befand. Nach erneuter Zugabe des *AE-Puffers* folgten Inkubation und Zentrifugation. Zur weiteren Verwendung der nun isolierten DNA wurden Volumina der Lösung mit einer 8-Kanal-Pipette in eine Deep-Well-Platte pipettiert und konnten bis zur Weiterverarbeitung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

### 2.3.2 DNA-Isolierung aus Nabelschnur Gewebe

Zur Isolierung der DNA aus den eingesandten Nabelschnur-Geweben wurde das *Puregene Cell & Tissue Kit* des Herstellers Qiagen verwendet.

Die Nabelschnüre wurden mit einem Skalpell zerkleinert und je 500 µL des Gewebes in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Das Gewebe wurde mit *Cell Lysis Solution* und *Proteinase K* versetzt und umgehend durch vorsichtiges Vortexen gemischt. Während einer Inkubation über Nacht führten diese Schritte zu Zelllyse und Abbau der Proteine im Lysat mit anschließender Freisetzung der Nukleinsäuren. Durch Zusatz von *RNase A Solution* und erneute Inkubation spaltete die enthaltene Ribonuklease A die RNA, sodass nur die DNA intakt blieb. Die anschließend hinzugefügte *Protein Precipitation Solution* führte zu einer Ausfällung der verunreinigenden Proteine. Durch die Präzipitation lagerten sich die Proteine in Form eines festen Pellets am Boden des Röhrchens ab. Diese Proteinfällung wurde wiederholt, indem der DNA-Überstand in ein neues Röhrchen transferiert wurde, in dem bereits *Protein Precipitation Solution* vorgelegt war. Zur Fällung der DNA wurde Isopropanol in ein weiteres Röhrchen pipettiert, der DNA-Überstand transferiert und das Röhrchen vorsichtig über Kopf geschwenkt. Nach anschließender Zentrifugation befand sich die DNA nun als Pellet am Boden des Röhrchens. Zu dessen Reinigung wurde Ethanol hinzugefügt und das Röhrchen so lange geschwenkt bis sich das Pellet löste. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Alkohol abgegossen und der Ethanol Waschschrift wiederholt. Nach einer Lufttrocknung des Röhrchens wurde die DNA in *DNA Hydration Solution* gelöst und über Nacht im Thermoschüttler inkubiert. Nach 12 Stunden erfolgte die abschließende Konzentrationsmessung der isolierten DNA vor der anschließenden Weiterverarbeitung.

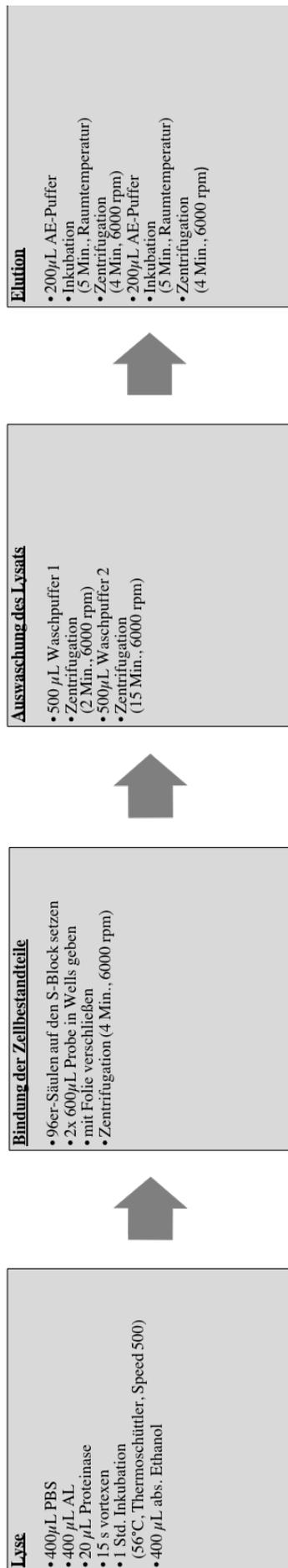


Abbildung 7: DNA Isolierung aus Mundschleimhaut Gewebe

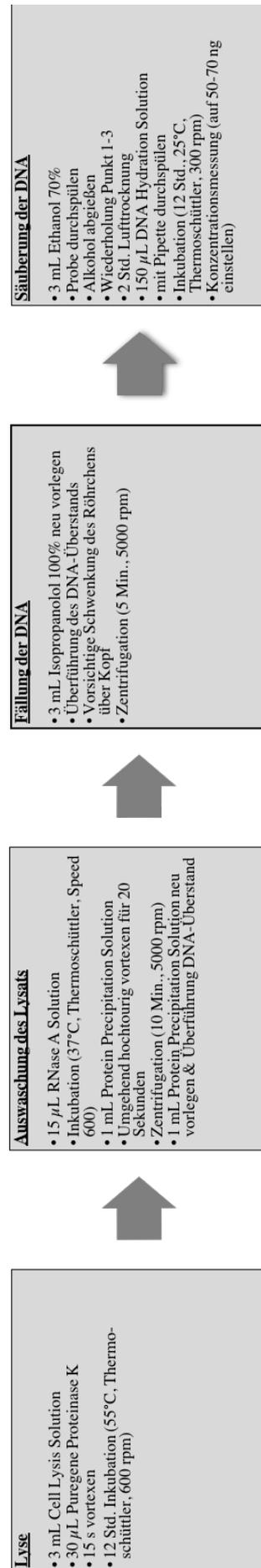


Abbildung 6: DNA Isolierung aus Nabelschnurgewebe

### 2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um geringe Mengen DNA gezielt anzureichern, bedient man sich der Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), einer in-vitro Vervielfältigung von DNA-Strängen durch thermostabile DNA-Polymerasen über mehrere Zyklen. 1983 entwickelte Kary Banks Mullis das Verfahren und wurde dafür 1993 mit dem Nobelpreis prämiert. (Mullis et al., 1986)

In der vorliegenden Arbeit diente das Verfahren der Vervielfältigung derjenigen Genabschnitte, welche die zu untersuchenden Polymorphismen enthielten. Erst nach Vervielfältigung der initial isolierten DNA war eine anschließende Sequenzierung möglich.

Bei der PCR wird der Doppelstrang der zu vervielfältigenden DNA durch Hitze aufgebrochen (denaturiert). Anschließend erfolgt die Zugabe eines synthetisch hergestellten Oligonukleotids (Primer), das an den aufgebrochenen DNA-Strang bindet. Daraufhin können durch eine Polymerase synthetisch hergestellte DNA Bauteile angeknüpft werden.

Die Vervielfältigung erfolgt in mehreren Zyklen, wobei das Produkt exponentiell vervielfältigt wird, da die bereits zuvor neu synthetisierte DNA in jedem weiteren Zyklus erneut als Matrizenvorlage dient.

#### 2.3.3.1 Vorbereitung des Reaktionsansatzes

Zur Vorbereitung der PCR erfolgte die Herstellung des hierfür benötigten Reaktionsansatzes.

Folgender Reaktionsansatz wurde jeweils pipettiert:

**Tabelle 4: PCR-Protokoll Reagenzien**

Reagenz	Hersteller	Volumen in $\mu\text{L}$ je Probe
Proben DNS		Verdünnt und getrocknet
Nabelschnur		1
Abstrich		2
TaqMan <sup>®</sup> Genotyping Master Mix	Applied Biosystems	2,5
Ampuwa <sup>®</sup>	Fresenius Kabi	2,4
SNP Genotyping Assay (40x)	Applied Biosystems	0,1

Bestandteile des TaqMan Genotyping Master Mix des Herstellers Life technologies sind eine synthetisch hergestellte thermostabile DNA Polymerase (AmpliTaq Gold DNA Polymerase), die Desoxyribonukleotid Triphosphat Basen (dTTPs), eine Referenz Komponente zur Korrektur fluoreszierender Veränderungen durch Konzentrations- oder Volumenunterschiede sowie Puffer Komponenten.

Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz zu der bereits isolierten DNA in die 384-Well-Platte hinzu pipettiert, wobei in jedem Well bereits 1 bzw. 2  $\mu$ L DNA vorgelegt waren.

### 2.3.3.2 Amplifikation der DNA unter Verwendung der PCR

Die Reaktionsschritte einer PCR laufen bei im Verlauf variierten Temperaturen in einer beheizbaren Reaktionskammer, dem Thermocycler, ab. Die doppelsträngige DNA wird im ersten Schritt denaturiert. Nun wird das zu untersuchende Fragment durch Primer, spezifische Oligonukleotide, markiert, die während der darauf folgenden Annealing Phase am 5'- und am 3' Ende des gewählten Bereichs komplementär an die genomische DNA binden (to anneal engl. stählen, härten). Mit Hilfe der AmpliTaq Gold DNA Polymerase wird das flankierte Fragment während der Elongationsphase durch komplementäres Anhängen der vier dNTPs klonal amplifiziert.

**Tabelle 5: PCR-Protokoll Ablauf**

<b>Reaktionsbedingungen</b>			
5	Min	95,0°C	initiale Denaturierung
30	Sec	92,0°C	Denaturierung
60	Sec	60,0°C	Annealing & Elongation
			finale Elongation

Die PCR erfolgte automatisiert in drei verschiedenen Geräten.

- Applied Biosystems Veriti 384 Well Thermal Cycler
- MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler
- TaqMan Applied Biosystems 7900 HT Fast Real-Time PCR System

### 2.3.4 Allelische Diskriminierung

Bei der allelischen Diskriminierung handelt es sich um ein PCR-basiertes Verfahren, mit dem im Rahmen von Genotypisierungen SNPs detektiert werden können.

Während der PCR werden zusätzlich zu den bereits aufgeführten herkömmlichen Bestandteilen eines PCR-Reaktionsansatzes fluorogene Sonden eingesetzt. Hierbei handelt es sich um sequenzspezifische Oligonukleotide, die am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff markiert sind, während das 3'-Ende ein s.g. Quencher Molekül (to quench engl. dämpfen) trägt. Der Quencher unterdrückt durch enge räumliche Nähe zum Reporter-Farbstoff dessen Fluoreszenzemission. Ursächlich hierfür ist der sogenannte „Fluorescent resonance energy transfer“ (FRET) Effekt.

Die synthetisch hergestellte rekombinante AmpliTaq DNA Polymerase ersetzt die physiologische DNA-Polymerase und verfügt über 5'-3'-Exonukleaseaktivität. Während der Extensionsphase fragmentiert sie, ausgehend vom 5'Ende, die Sonde. Der Farbstoff wird abgespalten. Es resultiert eine räumliche Trennung von Quencher Molekül und Reporterfarbstoff, sodass das Fluoreszenzsignal nicht weiter unterdrückt wird.

Die Emission wird in der anschließenden Messung durch das Taqman Gerät detektiert.

### 2.3.5 Auslesen und Auswertung

Die Auswertung und Quantifizierung der vorliegenden DNA erfolgte ausschließlich in dem Gerät TaqMan Applied Biosystems 7900 HT Fast Real-Time PCR System. Das Gerät ermittelt anhand von Fluoreszenzfarbstoffen die Existenz der Gen-Sequenz und somit den Genotypen, es erfolgt die Differenzierung in LP/LNP Proben.

## 2.4 5-Jahres-Nachuntersuchungen

### 2.4.1 Ablauf

Um die langfristige Entwicklung der Probanden nachverfolgen zu können, wird ein Teil der in die Studie eingeschlossenen ehemals sehr kleinen Frühgeborenen im Alter von fünf Jahren nachuntersucht. Es werden diverse Parameter erhoben, mit denen die langfristige Entwicklung objektiviert wird.

### 2.4.2 Erhobene Parameter

Die körperliche Entwicklung wurde anhand klar definierter und messbarer klinischer Endpunkte untersucht. Hierzu zählen Größe, Gewicht und Kopfumfang, Blutdruck und Herzfrequenz sowie Lungenfunktion, Seh- und Hörfähigkeit.

Die Erfassung der motorischen Leistungsfähigkeit erfolgte mit dem „Movement Assessment Battery for Children“ (M-ABC) Verfahren.

Die geistige Entwicklung wurde anhand des WPPSI (Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence – III) Intelligenztests quantifiziert, das Vorliegen einer Cerebralparese wurde durch den „Gross Motor Function Classification System“ beurteilt.

Die für diese Arbeit relevanten Parameter beschränkten sich auf Größe, Gewicht, Kopfumfang, Intelligenzquotienten und die Beurteilung einer möglichen Cerebralparese.

### 2.4.3 Erhebung der Daten

#### 2.4.3.1 Körpergröße, Körpergewicht, Kopfumfang

Um eine Vergleichbarkeit der Messergebnisse zu gewährleisten, erfolgen die Untersuchungen und Datenerhebungen der Nachuntersuchungen stets durch das gleiche Studienpersonal. Es werden alle verwendeten Untersuchungsmaterialien aus der Studienzentrale mitgebracht.

Die Körperlänge der Studienteilnehmer wird barfuß auf einem genormten Personenlängenmessgerät (*Harpender portable stadiometer, Holtain*) mit einer

Genauigkeit bis 0,1 cm ermittelt, das Körpergewicht der bis auf die Unterwäsche entkleideten Kinder wird auf einer *Personen-Waage des Herstellers ADE* (Produktbezeichnung M300020) mit einer Genauigkeit von 0,1 kg erhoben. Der Kopfumfang wird mit einem *Maßband (DKSH plastic tape)* auf Stirnhöhe oberhalb der Augenbrauen an der Stelle des größten Kopfumfanges mit einer Genauigkeit von ebenfalls 0,1 cm gemessen.

#### **2.4.3.2 Intelligenzquotient**

Die entwicklungsneurologische Nachuntersuchung wurde durchgeführt durch Nutzung des Wechsler Intelligenztests für Kindergarten- und Vorschulkinder, einer deutschsprachigen Adaptation des amerikanischen Testverfahrens WPPSI-III von David Wechsler (Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence, 2002, WPPSI-III Deutsche Version, überarbeitete und erweiterte Auflage 2014, Pearson Assessment & Information GmbH). Die Wechsler-Skalen dienen dabei der *Erfassung allgemeiner und spezifischer kognitiver Fähigkeiten* von Kindern im Alter zwischen 3 und 7 Jahren. Mit dem standardisierten Testverfahren des WPPSI-III kann ein Gesamt-IQ als Maß für den kognitiven Entwicklungsstand eines Kindes im Vorschulalter bestimmt werden. Die Mitarbeiter des Nachuntersuchungsteams haben vor der Durchführung eine zertifizierte Schulung durch den Hersteller Pearson erhalten und werten die Testung nach Vorgabe des dazugehörigen Manuals aus.

#### **2.4.3.3 Cerebralparese**

Die infantile Cerebralparese ist definiert als eine Bewegungsstörung aufgrund einer frühkindlichen Hirnschädigung vor, während oder nach der Geburt. [67]

Bei dem Gross Motor Function Classification System (GMFCS) handelt es sich um eine 5-stufige *Klassifikation*, die Kinder mit Cerebralparese anhand ihrer *funktionellen Einschränkungen, dem Gebrauch von Gehhilfen oder mobilen Hilfsmitteln* einteilt. Besondere Beachtung finden Sitzfähigkeit, Transfer und Mobilität. In Stufe 1 ist der Patient in der Lage selbstständig zu sitzen, zu gehen und zu hüpfen. Es folgt eine Abstufung mit Einschränkung der Gehfähigkeit und der Nutzung von mobilen Hilfsmitteln bis hin zur Rollstuhlabhängigkeit in Stufe 5. [68] In dieser Arbeit wird jeder *GMFCS >1 als Zeichen einer frühkindlichen Hirnschädigung* und somit als Defizit der kognitiven Entwicklung gewertet.

## 2.5 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms SPSS 20.0. für Windows (SPSS GmbH, München). Metrisch skalierte Variablen werden mittels Mittelwert und Standardabweichung dargestellt, nominale Variablen mittels ihrer absoluten Anzahl (n) sowie der prozentualen Häufigkeit. Der statistische Vergleich der zwei unverbundenen Gruppen erfolgte mit Hilfe statistischer Testung. Zur Überprüfung der Varianzhomogenität wurde jeweils zunächst der Levene Test angewendet, bei Gleichheitsannahme folgte die weitere Auswertung. Genutzt wurde der Students t-Tests für die normalverteilten, quantitativen Merkmale sowie der  $\chi^2$ -Tests (Test auf allelische Assoziation) für die qualitativen Merkmale. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt. Da es sich bei dieser Arbeit um die erste Untersuchung zum Einfluss der LP auf Gesundheit und Entwicklung Frühgeborener handelt, wurden die Ergebnisse nicht für multiples Testen korrigiert. Die Signifikanztests wurden stets zweiseitig durchgeführt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Studienpopulation

Im Zeitraum von 2009 bis 2015 wurden insgesamt 12.951 Frühgeborene (SSW <37+0) mit einem GG unter 1500g in die Studie eingeschlossen. Die erfolgreiche Genotypisierung für das Laktase-Persistenz-Gen erfolgte für 11.602 Frühgeborene, da zum Zeitpunkt der Auswertung in 500 Fällen die DNA noch nicht isoliert und in 849 Fällen die PCR primär technisch nicht erfolgreich war. Dies könnte einerseits technische Ursachen haben, auch könnte die Quantität der DNA zu gering gewesen sein. Dies entspricht einer Einschlussrate von 89,6%. Von den genotypisierten Frühgeborenen waren 8.476 (73,1%) deutscher maternaler Herkunft und 3.126 (26,9%) anderer maternaler Herkunft.

Bis zum 31.12.2017 waren 1.573 Frühgeborene aus der Studie im Alter von 5 Jahren nachuntersucht worden. Da bei 11 Kindern die Wachstumsdaten nicht komplett erhoben wurden, waren zum Auswertungszeitpunkt 1.562 Kinder erfolgreich genotypisiert und nachuntersucht.

Bei 11.602 genotypisierten Kindern konnte in 69,2% der Fälle (n=8.032) der dominante Polymorphismus, das T-Allel (Genotyp CT oder TT), und somit eine LP nachgewiesen werden. Das genetische Material der restlichen 30,8% (n=3.570) wies diesen Polymorphismus nicht auf. Die beiden Kollektive wurden nun auf statistisch signifikante Unterschiede hinsichtlich diverser Parameter untersucht.

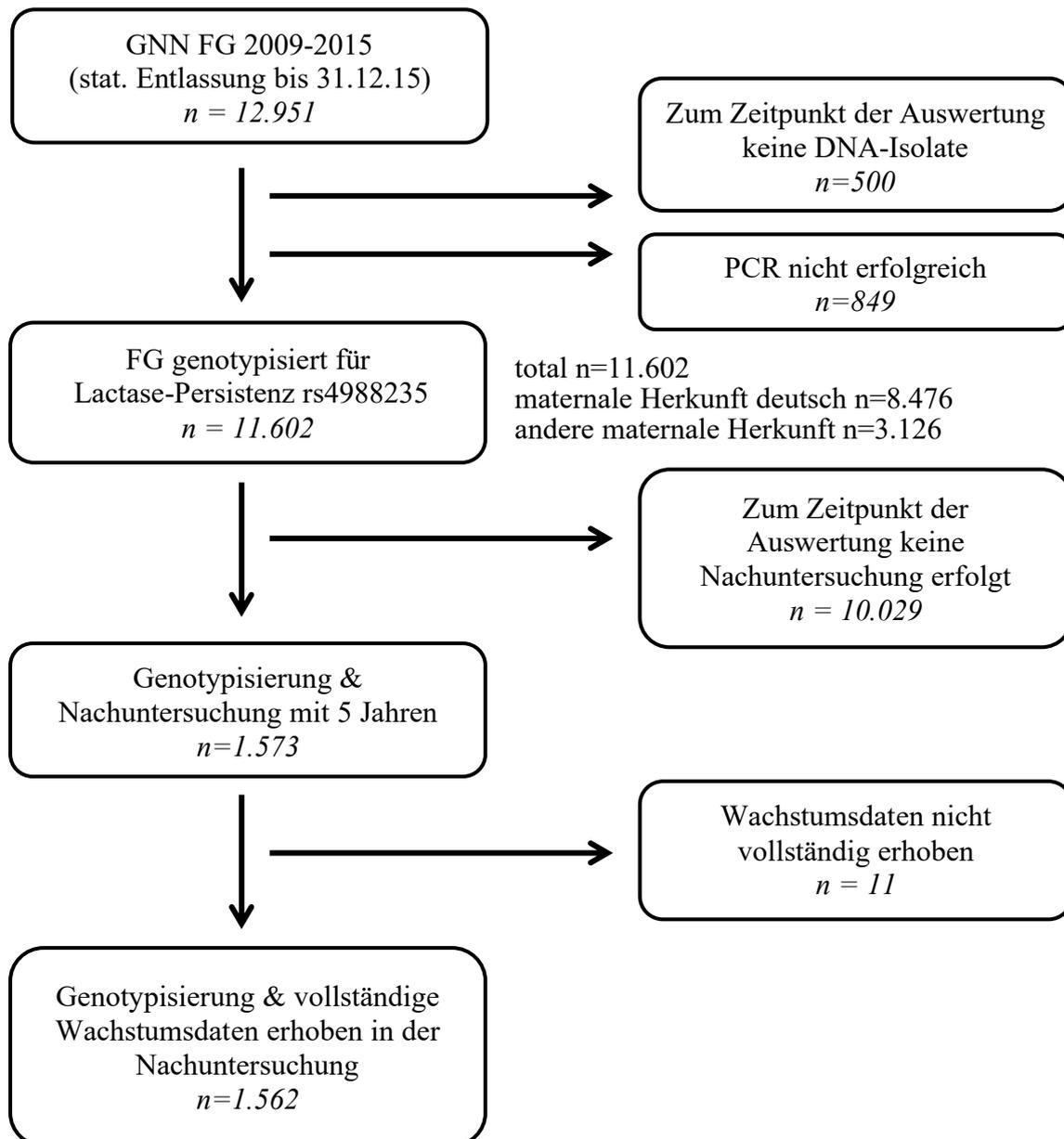


Abbildung 8: Studienpopulation

### 3.1.1 Klinische Daten

**Tabelle 6: Perinatale Daten der Studienpopulation**

n=11.602	Genotypen		Gesamtpopulation	p-Wert
	CC	CT/TT		
<b>Gestationsalter [Wochen]</b>	28,61 ± 2,76	28,72 ± 2,71	28,69 ± 2,72	0,027
<b>Geburtsgewicht [Gramm]</b>	1050 ± 305	1063 ± 305	1059 ± 305	0,050
<b>Geschlecht männlich/weiblich [%]</b>	50,0 / 50,0	51,9 / 48,1	51,3 / 48,7	> 0,05
<b>Mehrling [%]</b>	32,9	35,1	34,5	0,022
<b>SGA nach Voigt (P&lt;10) [%]</b>	18,0	18,3	18,2	> 0,05

*CC Genotyp: homozygot, Laktase-Nonpersistenz; CT bzw. TT Genotyp: heterozygot bzw. homozygot Laktase-Persistenz, SGA: small for gestational age; Die metrischen Variablen Gestationsalter und Geburtsgewicht sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben, nominale Variablen mittels ihrer prozentualen Häufigkeit. p-Werte wurden mit dem exakten Test nach Fisher errechnet.*

#### Klinische Daten

Tabelle 6 wird zunächst ein Überblick über das Gesamtkollektiv gegeben. Die Kinder wurden im Mittel am 5. Tag der 29. SSW (SSW 28+5) geboren. Das GA der Lak+ ist im Vergleich zu den Lak- Kindern (SSW 28,72 vs. SSW 28,61) leicht erhöht (p 0,027). Das kindliche GG betrug durchschnittlich 1059g, von den Kindern waren 51,3% männlichen und 48,7% weiblichen Geschlechts. 18,2% der Kinder wurden „small for gestational age“ (SGA) unter der 10. Perzentile geboren.

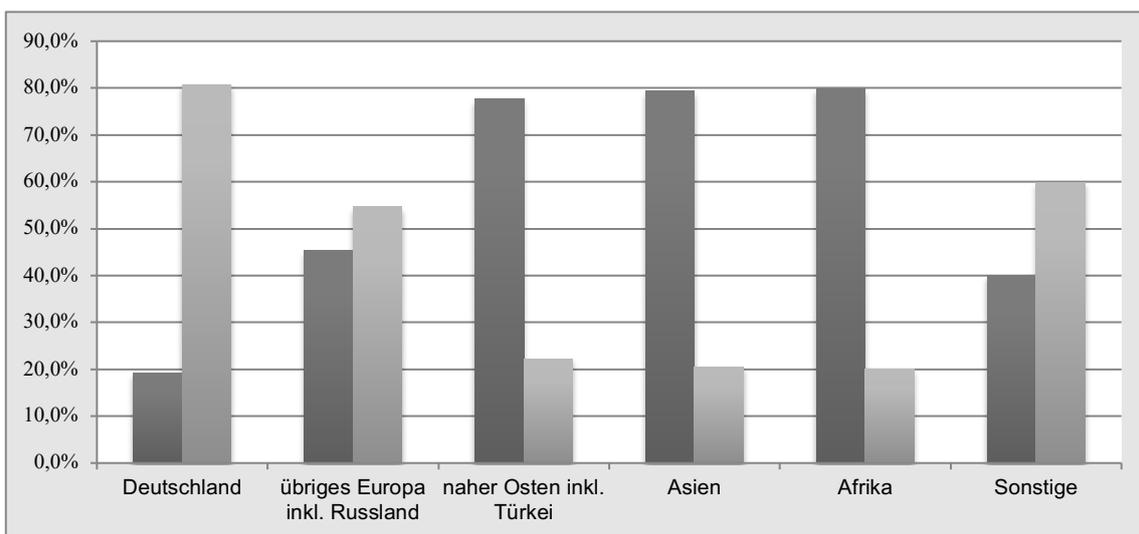
Im Bezug auf GG, Geschlecht und SGA ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Trägern des Laktase-Persistenz-Gens und denjenigen ohne den Polymorphismus. (jeweils p> 0,05)

Es lässt sich eine deutliche Korrelation zwischen Mehrlingsrate und dem LPG Status nachweisen. Von den 3.997 Mehrlingen, die in die Studie aufgenommen wurden, besitzen 70,6% das Laktase-Persistenz-Gen (n=2.821), bei den 7.604 Einlingen liegt dieser Anteil bei 68,5% (n=5.210). Ursächlich hierfür könnte der so genannte Ländereffekt sein, der sich durch eine erhöhte Häufigkeit von Zwillinggeburten innerhalb der stark vertretenen deutschen Population erklären lässt. Analysiert man isoliert die deutsche Population und die Korrelation zwischen der Mehrlingsrate

deutscher Mütter und dem Trägerstatus des LPG, so wird deutlich, dass kein Zusammenhang zu bestehen scheint.

### 3.1.2 Maternale Herkunft

Die Laktase-Persistenz in Abhängigkeit von der mütterlichen Herkunft ist in Abbildung 9 dargestellt. Wie erwartet kann die *starke Korrelation zwischen genetischer Herkunft und Laktase-Persistenz-Gen* bestätigt werden. 8 von 10 Kindern (80,7%) deutscher Herkunft besitzen den dominanten Polymorphismus, wohingegen lediglich 54,6% der Kinder von Müttern des übrigen Europas über das Abstillen hinaus Laktase exprimieren. Etwa jedes 5. Kind anderer Herkunft (naher Osten 22,3%, Asien 20,7%, Afrika 20,1%) ist Lak+.



**Abbildung 9: Laktase-Persistenz in Abhängigkeit von der mütterlichen Herkunft**

*Hellgrau: Laktase-Persistenz*  
*Dunkelgrau: Laktase-Nonpersistenz*

### 3.1.3 Kindliche Herkunft

Auf Grund des Einflussfaktors „maternale Herkunft“ sind die Studienergebnisse dieser Subpopulation zum Ausschluss eines systematischen Fehlers stratifiziert zu analysieren. In Tabelle 7 aufgeführt sind ausschließlich die Daten der Kinder, deren Mütter aus Deutschland stammen.

**Tabelle 7: Perinatale Daten der Population deutschen Ursprungs**

n=8.476	Genotyp		Gesamt	p
	CC	CT/TT		
<b>Gestationsalter [SSW]</b>	28,89 2,68	± 28,78 ± 2,68	28,80 ± 2,68	0,141
<b>Geburtsgewicht [g]</b>	1079 ± 297	1068 ± 304	1070 ± 303	0,185
<b>Geschlecht männlich/weiblich [%]</b>	50,5 / 49,5	51,9 / 48,1	51,6 / 48,4	0,313
<b>Mehrling [%]</b>	35,8	35,6	35,6	0,846
<b>SGA n. Voigt (P&lt;10) [%]</b>	18,5	18,4	18,4	0,915

*CC Genotyp: homozygot, Lak-; CT bzw. TT Genotyp: heterozygot bzw. homozygot, Lak+, SGA: Small for gestational age; metrische Variablen werden mittels Mittelwert ± Standardabweichung bzw. Median (IQR) dargestellt, nominale Variablen mittels ihrer prozentualen Häufigkeit. p-Werte wurden mit dem exakten Test nach Fisher errechnet.*

In dieser adaptierten Auswertung wird deutlich, dass die *Mehrlingsrate nicht signifikant von dem Polymorphismus abhängig* ist, die Herkunft begründet somit den bereits erwähnten systematischen Fehler.

Im Vergleich zur Gesamtpopulation ist in der deutschen Population das GA signifikant erniedrigt bei Lak- Kindern. Wie bereits bei der Gesamtpopulation hat das *Gen keinen Einfluss auf GG, Geschlecht und SGA*, all diese Parameter bieten keine signifikante Assoziation zu dem Polymorphismus des SNP rs4988235.

## 3.2 Komplikationen

Zu den typischen kurzfristigen Komplikationen der Frühgeburtlichkeit zählen Erkrankungen des Bauches (nekrotisierende Enterokolitis [NEC] und fokale intestinale Perforation [FIP]), des Herzens (persistierender Ductus Arteriosus Botalli, [PDA]), der Augen (Frühgeborenen Retinopathien, [ROP]) und des Gehirns (Periventriculäre Leukomalazie [PVL] und Hirnblutungen [IVH]). [69] Weiterhin wurden die Komplikationen Sepsis, durch Beatmung ausgelöste Lungenschäden (Bronchopulmonale Dysplasie [BPD], definiert als Sauerstoffsupplementationsbedarf mit SSW 36+0) sowie der stationäre Tod statistisch ausgewertet. (s. Tabelle 8) Beurteilt wurde jeweils die Inzidenz operativer Eingriffe, die auf Grund der jeweiligen Komplikation nötig wurden.

Tabelle 8: Kurzfristige Komplikationen in Abhängigkeit von der Laktase-Persistenz

	Genotypen		Gesamt	p
	CC	CT/TT		
<b>NEC</b>	2,6% (91/3565)	2,3% (185/8018)	2,4% (276/11583)	0,424
<b>FIP</b>	2,0% (72/3565)	2,0% (162/8012)	2,0% (234/11577)	0,993
<b>PDA</b>	4,2% (149/3565)	3,9% (312/8019)	4,0% (461/11584)	0,463
<b>ROP</b>	2,5% (88/3558)	2,5% (197/8015)	2,5% (285/11573)	0,961
<b>IVH</b>	16,3% (581/3566)	16,9% (1353/8021)	16,7% (1934/11587)	0,443
<b>PVL</b>	2,7% (95/3561)	3,0% (240/8008)	2,9% (335/11569)	0,330
<b>Sepsis mit Erregernachweis</b>	12,0% (424/3540)	11,9% (946/7971)	11,9% (1370/11511)	0,867
<b>BPD</b>	12,4% (431/3476)	12,9% (1007/7817)	12,7% (1438/11293)	0,477
<b>Tod (stationär)</b>	3,1% (112/3570)	3,4% (271/8032)	3,3% (383/11602)	0,510

CC Genotyp: homozygot, Lak-; CT bzw. TT Genotyp: heterozygot bzw. homozygot, Lak+. Metrische Variablen werden mittels Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt, nominale Variablen mittels ihrer prozentualen Häufigkeit und ihrer absoluten Anzahl. p-Werte wurden mit dem exakten Test nach Fisher errechnet.

Die vollständigen Daten inkl. „andere maternale Herkunft“ finden sich im Anhang als Tabelle S (S=Supplement). NEC: nekrotisierende Enterocolitis, FIP: fokale intestinale Perforation, PDA: persistierender Ductus arteriosus, ROP: Retinopathy of prematurity, Frühgeborenenretinopathie, PVL: periventrikuläre Leukomalazie, BPD: bronchopulmonale Dysplasie (Sauerstoffsupplementationsbedarf in SSW 36+0)

Besondere Beachtung finden im Zusammenhang mit der enteral exprimierten Laktase die abdominell gelegenen Komplikationen. Von den 11.583 Kindern, von denen Angaben diesbezüglich vorlagen, entwickelten 276 eine operationsbedürftige NEC. Dies entspricht einem Anteil von 2,4%. Die Kinder mit LPG entwickelten in 2,3% der Fälle eine NEC ( $p > 0,05$ ). Jedes 50. Kind mussten auf Grund einer FIP operiert werden. Hierbei zeigte sich kein Unterschied zwischen Kindern mit (72/3565  $\hat{=}$  2,0%) und ohne LPG (162/8012  $\hat{=}$  2,0%), ( $p$  0,993).

Es konnte somit keine signifikante Assoziation gefunden werden zwischen kurzfristigen abdominellen Komplikationen und dem untersuchten Polymorphismus.

Die verhältnismäßig häufigste kurzfristige Komplikation, die Hirnblutung, trat mit 16,3 % bzw. 16,9 % in dieser Studienpopulation bei beiden Kollektiven gleich häufig auf.

Bei Kindern mit Sepsis konnte ein Erreger mittels positiver Blutkultur nachgewiesen werden, aufgeführt werden sowohl early- als auch late onset Septitiden. Die Häufigkeit des Auftretens einer Sepsis war bei Kindern in beiden Kohorten weitestgehend vergleichbar und betraf jedes 8. Kind.

Frühgeborene mit LP zeigten darüber hinaus kein signifikant häufigeres Auftreten einer ROP, einer BPD, einer PVL oder eines PDA. (jeweils  $p > 0,05$ ).

### 3.3 Wachstum

#### 3.3.1 Wachstum im Neugeborenen Alter

Die 11.006 Kinder, von denen Daten zum Körperlängen-Wachstum erhoben wurden, blieben durchschnittlich 69 Tage in stationärer Versorgung. Es zeigte sich kein Unterschied in der stationären Aufenthaltsdauer von Kindern beider Genotypen.

Die Neugeborenen waren durchschnittlich 36,49 cm ( $\pm 3,86$  cm) lang und maßen bei Entlassung 45,98 cm. Dies entspricht einer Körperlängenzunahme von durchschnittlich 0,14 cm pro Tag. Dieses durchschnittliche Wachstum zeigte sich sowohl bei Kindern mit als auch bei denjenigen ohne Polymorphismus.

**Tabelle 9: Körperlängenwachstum während des stationären Aufenthaltes**

n=11.006	Genotypen		Gesamt	p
	CC	CT/TT		
<b>Tage stationär</b>	70 $\pm$ 38	68 $\pm$ 35	69 $\pm$ 36	> 0,05
<b>Körperlänge [cm]</b>	36,38 $\pm$ 3,88	36,54 $\pm$ 3,86	36,49 $\pm$ 3,86	> 0,05
<b>Körperlänge bei Entlassung [cm]</b>	46,02 $\pm$ 3,66	45,96 $\pm$ 3,57	45,98 $\pm$ 3,59	> 0,05
<b>Körperlängenzunahme [cm/d]</b>	0,14 $\pm$ 0,06	0,14 $\pm$ 0,09	0,14 $\pm$ 0,09	> 0,05

*CC Genotyp: homozygot, Lak-; CT bzw. TT Genotyp: heterozygot bzw. homozygot Lak+; Für alle Parameter sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Zweiseitige p-Werte wurden mit dem exakten Test nach Fisher errechnet.*

Im Durchschnitt kamen die Kinder mit einem GG von 1063 g auf die Welt und nahmen während der stationären Versorgung 1500 g an Gewicht zu. Bei einer mittleren Aufenthaltsdauer aller Kinder, von denen Daten zur Körpergewichtsentwicklung vorlagen, von 68 Tagen entspricht dies einer Gewichtszunahme von 22,91g pro Tag. Lak+ nahmen im Durchschnitt nicht signifikant mehr Gewicht zu (23,16g/Tag).

Tabelle 10: Zunahme des Körpergewichts während des stationären Aufenthaltes

n=11.418	Genotypen		Gesamt	p-Wert
	CC	CT/TT		
<b>Tage stationär</b>	69 ± 38	68 ± 36	68 ± 36	> 0,05
<b>Geburtsgewicht (g)</b>	1054 ± 304	1067 ± 303	1063 ± 303	> 0,05
<b>Körpergewicht bei Entlassung</b>	2579 ± 667	2557 ± 662	2563 ± 663	> 0,05
<b>Gewichtszunahme (g/d)</b>	23,16 ± 13,49	22,80 ± 8,39	22,91 ± 10,23	> 0,05

CC Genotyp: homozygot, Lak+; CT bzw. TT Genotyp: heterozygot bzw. homozygot Lakt+; Für alle Parameter sind jeweils die Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben. Zweiseitige p-Werte wurden mit dem exakten Test nach Fisher errechnet.

Auch bei der Zunahme des Kopfumfanges (25,78 cm bei Geburt; 32,69 cm bei Entlassung, 0,10 cm Wachstum pro Tag) lässt sich kein signifikanter Unterschied erheben.

Tabelle 11: Zunahme des Kopfumfanges während des stationären Aufenthaltes

n=11.121	Genotypen		Gesamt	p-Wert
	CC	CT/TT		
<b>Tage stationär</b>	70 ± 38	68 ± 35	69 ± 36	> 0,05
<b>Kopfumfang bei Geburt [cm]</b>	25,69 ± 2,61	25,81 ± 2,61	25,78 ± 2,61	> 0,05
<b>Kopfumfang bei Entlassung [cm]</b>	32,73 ± 2,29	32,67 ± 2,27	32,69 ± 2,27	> 0,05
<b>Kopfumfangszunahme (cm/d)</b>	0,11 ± 0,08	0,10 ± 0,05	0,10 ± 0,06	> 0,05

CC Genotyp: homozygot, Lak-; CT bzw. TT Genotyp: heterozygot bzw. homozygot, Lak+; für alle Parameter sind jeweils die Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben. Zweiseitige p-Werte wurden mit dem exakten Test nach Fisher errechnet.

Die Unterschiede der Fallzahl und stationäre Aufenthaltsdauer zum Wachstum während des stationären Aufenthaltes liegt der unterschiedliche Anzahl ausgewerteter Daten aufgrund fehlender Werte zugrunde.

### 3.3.2 Wachstum im Alter von fünf Jahren

Bei der 5-Jahres-Nachuntersuchung wurden Körpergewicht, Kopfumfang und Körperlänge der Kinder bestimmt. Das durchschnittliche Körpergewicht der Frühgeborenen betrug im Alter von 5 Jahren 18,37 kg mit einer Standardabweichung von 3,18 kg (n=1573). Es imponierte eine signifikante Gewichtsdivergenz innerhalb des untersuchten Kollektivs. Lak- Kinder (n=420) wiegen im Alter von 5 Jahren 440g mehr als Lak+ Kinder (n=1153). Bei Kopfumfang (Mittelwert 50,19 ± 2,04 cm) sowie Körperlänge (Mittelwert 111,73 ± 5,89 cm) zeigten sich keine signifikanten Differenzen (n=1569 bzw. n=1573). Der Body Mass Index (BMI) konnte bei 1562 Kindern des Kollektivs ermittelt werden und betrug im Durchschnitt 14,62 kg/m<sup>2</sup>. Bei einem Alter von 60 Lebensmonaten entspricht dieses Gewicht der 26. bzw. 29. Perzentile (Jungen bzw. Mädchen) in einem Kollektiv aus reifgeborenen Kindern der 40+0 Schwangerschaftswoche. (Perzentilen nach KiGGs Studie, RKI 2013) [70]. Folglich sind die Frühgeborenen dieser Studie insgesamt leichter als reifgeborene Kinder.

**Tabelle 12: Wachstumsdaten im Alter von 5 Jahren**

	Genotypen		Gesamt	p
	CC	CT/TT		
<b>Gewicht mit 5 Jahren [kg] (n=1573)</b>	18,69 ± 3,54	18,25 ± 3,03	18,37 ± 3,18	0,013
<b>Kopfumfang mit 5 Jahren [cm] (n=1569)</b>	50,13 ± 1,94	50,21 ± 2,07	50,19 ± 2,04	0,903
<b>Körperlänge mit 5 Jahren [cm] (n=1570)</b>	112,03 ± 6,10	111,62 ± 5,81	111,73 ± 5,89	0,773
<b>BMI [kg/m<sup>2</sup>] (n=1562)</b>	14,77 ± 1,72	14,57 ± 1,48	14,62 ± 1,55	0,005

*CC Genotyp: homozygot, Lak-; CT bzw. TT Genotyp: heterozygot bzw. homozygot Lak-; Die metrischen Variablen werden mittels Mittelwert ± Standardabweichung bzw. Median (IQR) dargestellt. p-Werte wurden mit dem exakten Test nach Fisher errechnet.*

### 3.4 Neurokognitive Entwicklung

Die Beurteilung der langfristigen kognitiven Entwicklung im Alter von fünf Jahren erfolgte auf Grundlage des ermittelten Intelligenzquotienten durch den WPPSI-III Test sowie der Beurteilung einer möglichen Cerebralparese durch das GMFCS. Sowohl der Intelligenzquotient als auch das Auftreten einer Cerebralparese wurden dichotomisiert. Als kognitive Entwicklungsverzögerung gewertet wurden ein  $IQ < 85$  oder ein  $GMFCS > 1$ .

In Tabelle 13 sind die Daten zur langfristigen kognitiven Entwicklung dargestellt. Bei der Betrachtung der Ergebnisse aller Kinder, mit denen im Rahmen der Nachuntersuchung der Intelligenztest durchgeführt werden konnte ( $n=1.452$ ), ergab sich ein durchschnittlicher IQ von 95,9. Als Grundlage dieses IQ-Tests wird ein Median von 100 festgelegt, eine Standardabweichung beträgt 15. Der Durchschnitt unserer Studienpopulation hatte somit einen IQ innerhalb der ersten Standardabweichung (SD). Lak+ Kinder haben diesen Daten zufolge jedoch durchschnittlich einen über 3 Punkte höheren Quotienten als Lak- Kinder. Auch ließen sich in dieser Gruppe deutlich weniger Kinder mit einem  $IQ < 85$  ( $> 1$  SD) ermitteln ( $n=167$  von  $1065 \pm 15,68\%$  vs.  $n=90$  von  $387 \pm 23,25\%$ ).

Stratifiziert man diese Analysen der neurokognitiven Entwicklung jedoch nach der maternalen Herkunft, stellen sich die Werte anders dar. Der durchschnittliche Gesamt-IQ der Kinder deutscher mütterlicher Herkunft liegt bei 97,3 Punkten ( $n=1192$ ), die Rate an Patienten mit Cerebralparese bei 5,1% ( $n=1210$ ) und der Anteil der Kinder mit einem  $IQ < 85$  beträgt 14,4% ( $n=1192$ ). Innerhalb dieses Patientenkollektivs unterscheidet sich der Gesamt-IQ von Kindern lediglich um 0,2 Punkte (Lak- IQ 97,2 vs. Lak+ 97,4), der Anteil an Kindern mit kognitiver Entwicklungsverzögerung unterscheidet sich nur um knapp 0,5 Prozentpunkte (Tabelle 13). Es ist daher bei der langfristigen kognitiven Entwicklung von einem deutlichen Ländereffekt auszugehen. Ursächlich hierfür könnten verbale Defizite sein. Der in dieser Studie verwendete WPPSI-III Test, ebenso wie alternative üblicherweise angewandte Standard Intelligenztests, basiert maßgeblich auf dem Verständnis und der Wiedergabe der deutschen Sprache. Es ist daher davon auszugehen, dass eine Verzerrung auf Grund sprachlicher Barrieren besteht, weshalb die Testung nicht uneingeschränkt die kognitiven Fähigkeiten aller Kinder darstellt [71]. Wenn zum

Ausschluss systematischer Fehler ausschließlich die Ergebnisse der deutschen Kinder analysiert werden, erkennt man diesen Effekt deutlich.

Es lässt sich feststellen, dass LP keinen selektiven Vor- oder Nachteil für die langfristige kognitive Entwicklung der Frühgeborenen bietet.

**Tabelle 13: Langfristige kognitive Entwicklung**

Maternale Herkunft		Genotypen		Gesamt	p
		CC	CT/TT		
Deutschland	Gesamt IQ (n=1192)	97,20 ± 14,95	97,40 ± 15,19	97,36 ± 15,14	0,856
	CP (GMFCS>1) (n=1210)	6,6% (15/229)	4,8% (47/981)	5,1% (62/1210)	0,27
	IQ < 85 (n=1192)	14,8% (35/237)	14,3% (137/955)	14,4% (172/1192)	0,86
	CP (GMFCS>1) bzw. IQ < 85 (n=1283)	16,8% (42/250)	14,7% (152/1033)	15,1% (194/1283)	0,4
alle Länder	Gesamt IQ (n=1452)	93,72 ± 15,99	96,71 ± 15,61	95,91 ± 15,76	0,001
	CP (GMFCS>1) (n=1496)	5,9% (23/391)	5,5% (60/1095)	5,6% (83/1496)	0,766
	IQ < 85 (n=1452)	23,3% (90/387)	15,7% (167/1065)	17,7% (257/1452)	0,01
	CP (GMFCS>1) bzw. IQ < 85 (n=1578)	22,9% (97/423)	16,2% (187/1155)	18,0% (284/1578)	0,02

*CC Genotyp: homozygot, Lak-; CT bzw. TT Genotyp: heterozygot bzw. homozygot Lak+; IQ: Intelligenzquotient, CP: Cerebralparese, GMFCS: Gross motor function classification system; Die nominalen Variablen werden mittels ihrer prozentualen Häufigkeit und ihrer absoluten Anzahl angegeben. p-Werte wurden mit dem exakten Test nach Fisher errechnet*

## 4 Diskussion

Die Geburt von Säuglingen vor der vollendeten 37. SSW nahm in den vergangenen Jahrzehnten weltweit kontinuierlich zu [72]. Trotz beachtlicher Fortschritte in der Therapie von Neonaten bleibt Frühgeburtlichkeit heutzutage der bedeutendste Risikofaktor für Morbidität und Mortalität im Säuglingsalter [73]. Dies gilt nicht nur für weniger sondern auch für hoch entwickelte Länder [74]. Die Überlebensraten sehr unreifer Frühgeborener stiegen in der Vergangenheit auf Grund verbesserter perinataler Versorgung und medizinischen Fortschritts stetig an, die langfristige Entwicklung dieser Kinder blieb jedoch lange Zeit unzureichend erforscht. Erst im letzten Jahrzehnt wurde ein besonderes Augenmerk auf diese Entwicklung gelegt. Die Diskussion um die Beeinflussung der langfristigen Entwicklung dieser Kinder nahm zu. Der Ansatz der individualisierten oder auch personalisierten Therapie ist insbesondere in der Onkologie bereits seit einigen Jahren fester Bestandteil neuer Therapieansätze. Auf Grund der vielversprechenden Zukunftsperspektive wird umfangreiche Forschung betrieben [52,75]. Hierbei gilt es, den Patienten anhand primär ermittelter genetischer Marker individuell erfolgsversprechend zu therapieren. Um eine so genannte stratifizierte Therapie auch in der Neonatologie anwenden zu können, ist jedoch die Kenntnis der einzelnen Einflussfaktoren essentiell. Daher haben Wissenschaftler in der Vergangenheit begonnen, genetische Faktoren zu identifizieren, die zu einem besonders günstigen langfristigen Verlauf führen.

Dieser Forschung schloss sich die vorliegende Arbeit an, in der mögliche Auswirkungen des Laktase-Persistenz-Gens auf die Entwicklung VLBW Frühgeborener untersucht wurden. Der Polymorphismus des LPG ist assoziiert mit einer besseren Verträglichkeit von Milch und Milchprodukten und führt somit zu einem genetisch determiniert erhöhten Milchkonsum [63]. Grund ist die fortlaufende Expression des LPH und damit die andauernde Fähigkeit, Laktose, das Disaccharid in Milch, zu verdauen und als Nahrungsmittel auch im Erwachsenenalter zu verwerten.

Erstmals Erwähnung fand der Polymorphismus 2002 in einer Arbeit der Studiengruppe um den libyschen Forscher Enattah. Die Gruppe widmete sich einer finnischen Kohorte und untersuchte in dieser die „adult-type hypolactasia“, d.h. die Unterfunktion der Laktase im

Erwachsenenalter. Seither zählt der Polymorphismus rs4988235 zu einem der in der Literatur am häufigsten erwähnten und diskutierten SNP. Der Laktose Metabolismus fasziniert seit vielen Jahren Anthropologen, Genetiker, Physiologen und Mediziner [26]. Ursächlich ist unter anderem die Tatsache, dass es sich um eines der stärksten Beispiele für positive Selektion im menschlichen Genom handelt [27]. Der Polymorphismus bietet einen geschätzten Selektionsvorteil von 4-5% je Generation und gehört damit zu den in den letzten 10.000 Jahren der Evolution am stärksten selektierten genetischen Regionen [26]. In der 2004 veröffentlichten Studie von Bersaglieri et al. wurde ermittelt, dass Personen mit der Mutation bis zu 19% fruchtbarere Nachkommen bekamen als diejenigen ohne die Mutation [39]. In Studien zeigte sich bei Erwachsenen und Jugendlichen mit LP ein höheres Körpergewicht und besseres Wachstum, insbesondere bei milchreicher Ernährung [63,76]. Die vielfach diskutierte Theorie der Nischenkonstruktion (auch „Gen-Kultur Ko-Evolution“) intensivierte die Forschung diesbezüglich. Hierbei handelt es sich um die Theorie, dass sich genetische Evolution und kulturelle Evolution der Homo sapiens gegenseitig beeinflussen. Die Laktosetoleranz bildet hierfür ein Exempel [31].

Bislang wurde bislang jedoch noch keine Kohorte von Frühgeborenen auf die Effekte der LP untersucht. Dieser Untersuchung wurde die vorliegende Arbeit gewidmet. Nach der *DNA-Isolierung* aus Mundschleimhaut bzw. Nabelschnurgewebe erfolgte die *Genotypisierung des rs4988235 Polymorphismus mittels PCR und Diskriminierung der Allele durch Fluoreszenzmarker*. Frühgeborene mit dem Genotyp CT oder TT wurden als Kinder mit Laktase-Persistenz (Lak +), Frühgeborene mit dem Genotyp CC als Kinder ohne Laktase Persistenz (Lak -) kategorisiert. Die Kohorten wurden *binär* verglichen in Bezug auf Parameter, die als *valide Marker für die kurz- und langfristige Entwicklung der Kinder* gelten. Ziel dieser Arbeit war die Identifikation von Faktoren, die zu einem besonders günstigen kurz- und langfristigen Verlauf bei Frühgeborenen führen. Sollte sich der untersuchte Polymorphismus als protektiv erweisen, könnte er imitiert werden indem beispielsweise Laktase zugeführt werden könnte. Sollte ein erhöhter Milchkonsum eine negative Entwicklung der Kinder zur Folge haben, könnte dies zum Beispiel Einfluss auf die Ernährungsempfehlungen für Frühgeborene im Kleinkindalter haben.

## 4.1 Inzidenz im internationalen Vergleich

Die Ergebnisse dieser Studie reihen sich ein in eine Vielzahl an Studien, die die Inzidenz der Laktase-Persistenz weltweit untersuchten. Die Prävalenz der einzelnen Polymorphismen ist stark herkunfts- und damit populationsabhängig. Auch in unserer Studie bestätigt sich die starke Korrelation von genetischer Herkunft und LP. Etwa *8 von 10 Kindern* (80,7%) *deutscher Herkunft* besitzen den dominanten Polymorphismus, wohingegen lediglich 54,6% der Kinder von Müttern des *übrigen Europas* über das Abstillen hinaus Laktase exprimieren. Etwa *jedes 5. Kind anderer Herkunft* (nahe Osten 22,3%, Asien 20,7%, Afrika 20,1%) ist Lak+. Diese Beobachtung ist uneingeschränkt kongruent mit den bisher durchgeführten Studien zum Thema Laktase-Persistenz [44–46]. Die höchste Prävalenz in Europa ist auf den britischen Inseln sowie in Skandinavien zu beobachten (0,89-0,96) und nimmt Richtung Südosten ab. So fanden unter anderem Almon et al. 2011 heraus, dass die Laktasepersistenz in Schweden 91% beträgt. Die niedrigste Prävalenz in Europa liegt in der östlichen mediterranen Region vor, hier kann eine Prävalenz von nur 0,15 beobachtet werden [35,77]. Eine ähnliche Verteilung lässt sich in Indien beobachten, wo ebenfalls nördlich höhere Prävalenzen beobachtet werden als südlich [78,79]. Auf dem afrikanischen Kontinent ist die Ausprägung sehr ungleichmäßig und variiert beispielsweise selbst innerhalb des Landes Ruanda zwischen 0,02 und 0,92 [80]. Grund hierfür ist das *ungleiche Ausmaß des Verzehrs von Milch und Milchprodukten als Grundnahrungsmittel*. Dieses Muster der unterschiedlichen Fähigkeit, Laktose zu verwerten, kann auch an beduinischen und nicht-beduinischen Populationen, aus den gleichen Regionen des mittleren Ostens stammend, beobachtet werden [77]. Die Studiengruppe um Bersaglieri konnte 2004 die LP unter Amerikanern unterschiedlichen Ursprungs ermitteln. 77% der Amerikaner europäischen Ursprungs wiesen eine LP auf, 14% afrikanischen Ursprungs und kein Amerikaner asiatischen Ursprungs.

In der Gruppe der Studienteilnehmer konnte eine LP Inzidenz von 69,2% ermittelt werden. Da die Studienpopulation dieser Arbeit genetisch sehr heterogen war, analysierten wir im Anschluss vorrangig deutsche Kinder, da sie die demographisch größte Gruppe der Kohorte darstellten. (n=8.476). Multiple Studien belegen, dass die in dieser Studie ermittelten 80% LP in der Bevölkerung deutscher Herkunft zutreffen. In einer Studienpopulation an 258 deutschen Frauen trugen 23,6% den Genotyp CC [48], Büning et al. ermittelten einen ähnlichen Wert mit 21,4% an einer Kohorte aus 187 gesunden

deutschen Individuen [81]. Bereits im Mittelalter wurden an einer Kohorte aus 18 Probanden ähnliche Ergebnisse mit einer LP von 72% ermittelt [43].

Im internationalen Vergleich ist bei Beurteilung der LP jedoch nicht ausschließlich der SNP rs4988235 zu berücksichtigen. Neben dem SNP rs4988235 existieren weitere Polymorphismen, die zu LP führen. Die Polymorphismen *C/G-13907*, *T/C-13913*, *G/C-14010*, *-13910\*T* und *T/G-13915* sind in diesem Zusammenhang zu erwähnen [44]. Diese Polymorphismen liegen ebenfalls auf Chromosom 2, jedoch an anderer Position. Den häufigsten Polymorphismus bei Individuen europäischen Ursprungs stellt allerdings der SNP rs4988235 dar, der daher in dieser Studie untersucht wurde.

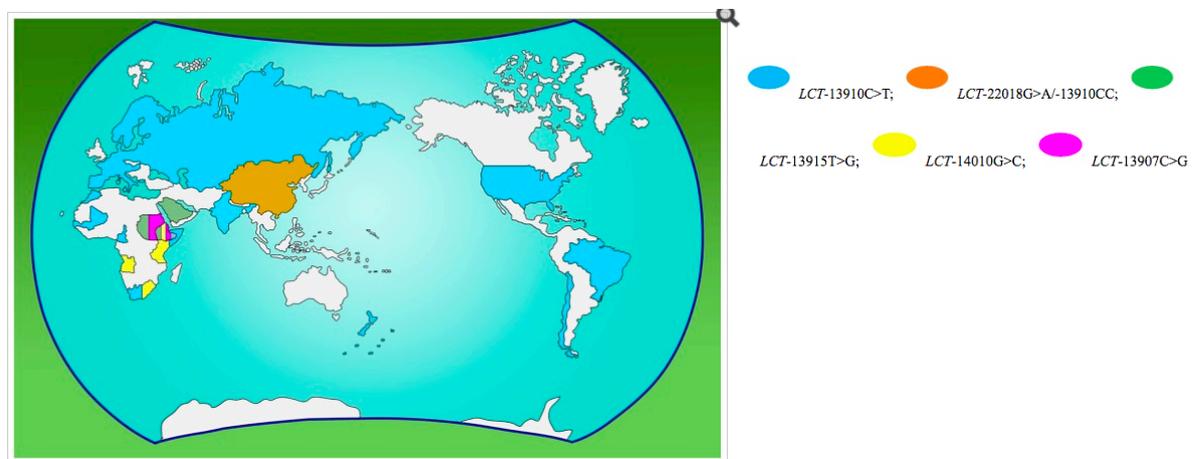


Abbildung 10 Tendenz von polymorphen Varianten der LP weltweit  
Modifiziert nach Mattar et al. [32]

## 4.2 Klinische Daten und Komplikationen

Beim Vergleich der Basisdaten fiel auf, dass Lak+ Frühgeborene ein um etwa einen Tag höheres GA aufwiesen (SSW 28,72 vs. SSW 28,61). Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte in der Ernährung der Mutter während der Schwangerschaft liegen. *Vitamin-D Mangel* im Blut schwangerer Frauen und somit auch im Nabelschnurblut sind eng mit Präeklampsie, Gestationsdiabetes und infektiösen Erkrankungen assoziiert [82]. Diese Faktoren führen in erhöhtem Maße zu Frühgeburtlichkeit [83].

Weiterhin ist der sich entwickelnde Fetus stark abhängig von maternalem Calcium- und 25(OH)-D (aktives Vitamin D3) Transfer über die Plazenta. Der *Calcium Bedarf* des Fetus

steigt während der Schwangerschaft von 50mg/Tag auf bis zu 330 mg/Tag zum Ende der Schwangerschaft kontinuierlich an. Ein hohes GG, ein reduziertes Risiko für frühzeitige Entbindung sowie eine bessere Kontrolle des Blutdrucks sind mit einem adäquaten Calciumspiegel der Mutter während der Schwangerschaft assoziiert [84]. Hofmeyr et al. gehen in einem Review von 2006 so weit zu behaupten, dass das Risiko einer Präeklampsie durch Calcium Supplementierung während der Schwangerschaft nahezu halbiert werden kann und somit ein wichtiger Faktor in der Prävention von Frühgeburtlichkeit ist [85]. Geht man auf Grund des dominanten Erbganges der LP davon aus, dass Mütter Lak+ Kinder häufiger ebenfalls mehr Milchprodukte zu sich nehmen [86], dann nehmen diese Frauen durch die Milchprodukte vermehrt Calcium und Vitamin D zu sich. Einer italienischen Nahrungsstudie zufolge wird >50% des Gesamtkalziums über Milchprodukte eingenommen [87]. Auch haben Menschen mit LP einen höheren BMI, sodass diese Mütter möglicherweise besser ernährt sind [86].

Maternale Nährstoffversorgung und Gewichtszunahme während der Schwangerschaft sind die zwei Hauptfaktoren, die maßgeblich das maternale und kindliche Outcome beeinflussen [88].

Die Geburtsgröße stellt weiterhin einen wichtigen Determinanten der perinatalen Überlebensrate dar [89]. Die Identifizierung von Faktoren, die das fetale Wachstum positiv beeinflussen, könnte zu neuen Maßnahmen für die Prävention neonataler Mortalität und Morbidität führen. Entgegen der Erwartungen hat der untersuchte Polymorphismus jedoch keinen Einfluss auf anthropometrische Variablen bei Geburt. Das durchschnittliche GG dieser Kohorte betrug 1059g, die Körperlänge 36,49cm. Die Ergebnisse dieser Studienpopulation waren kongruent mit den Daten der Studienpopulation einer Frühgeborenen Studie aus Tübingen aus dem Jahr 2007, bei denen das GG durchschnittlich 1097 g und die Körperlänge 37,02 cm betrug. Es wurde jedoch keine Assoziation zwischen GG bzw. KL und dem von uns untersuchten Polymorphismus gefunden.

Konträr zu unseren Ergebnissen wurde 2007 ermittelt, dass Milchkonsum während der Schwangerschaft die Größe des Kindes bei Geburt positiv beeinflusst [90]. Eine mögliche Ursache dieser diskrepanten Ergebnisse sind die Unterschiede der Kohortencharakteristika und des Studiendesigns, da Olsen et al. die Geburtsgröße reifgeborener Kinder postnatal bestimmten. Zusätzlich zeigte sich in der Studiengruppe um Olsen erst ab einem Milchkonsum von > 4 Gläser pro Tag eine signifikante Korrelation. 2004 berichteten Moore et al. aus einer australischen Kohorte von ca. 550 Frauen, bei denen die tägliche

Energiezufuhr maßgeblich das kindliche Gewicht und Größe beeinflusste [91]. Die Studie differenzierte allerdings lediglich die Aufnahme der einzelnen Nahrungskomponenten (Proteine, Kohlenhydrate, Fette) und traf somit keine explizite Aussage über den Milchkonsum. Dennoch konnte in diversen weiteren Studien häufig, jedoch nicht immer, ein erhöhtes GG bei maternal hohem Milchkonsum während der Schwangerschaft nachgewiesen werden. Eine Erklärung hierfür liefern ebenfalls die Ein- und Ausschlusskriterien, da keine der genannten Studien Frühgeborene einbezog. Die Mineralisierung des fetalen Skeletts erfolgt überwiegend im 3. Trimester der Schwangerschaft, etwa 80% des Gesamtbedarfs an Calcium akkumuliert erst zu diesem späten Zeitpunkt der Schwangerschaft [92]. Das durchschnittliche GA unserer Studienteilnehmer beträgt 28,69 SSW, das 3. Trimester wurde folglich noch nicht erreicht. Das Ausmaß des Calciumkonsums der Mutter konnte bis zu diesem Zeitpunkt daher keine relevanten Auswirkungen auf das fetale Wachstum haben.

In der statistischen Auswertung der gesamten Kohorte war eine Korrelation zwischen Mehrlingsrate und LP zu beobachten. Es zeigte sich, dass Mehrlinge signifikant häufiger, in 35,1% der Fälle, eine LP aufweisen als Einlinge mit 32,9%. Erklärbar ist dieses Phänomen mit dem so genannten Ländereffekt. In entwickelten Ländern werden statistisch häufiger Mehrlinge geboren als in Entwicklungsländern [93]. Die Studienpopulation schließt Kinder verschiedenen genetischen Ursprungs ein. Etwa  $\frac{2}{3}$  der Kinder sind deutschen Ursprungs (n=8.476), 3.126 Kinder (26,9%) sind nicht deutschen Ursprungs. Die sehr heterogene Studienpopulation ist somit statistisch auf Grund der Dominanz der deutsch stämmigen Kinder nicht einwandfrei zu beurteilen. Bei der isolierten Betrachtung der deutschen Population wird deutlich, dass tatsächlich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Mehrlingsrate und der LP besteht. Einen Zwilling haben 35,8% der Kinder mit LPG und 35,6% der Kinder ohne LPG. Eine Geschlechterwendigkeit war nicht nachvollziehbar.

Zu den häufigen kurzfristigen Komplikationen der Frühgeburtlichkeit zählen abdominelle Erkrankungen wie die NEC oder die FIP.

Viele Beobachtungsstudien geben Hinweise darauf, dass die *Muttermilchfütterung* Frühgeborener -im Vergleich zur Ernährung mit Formula Nahrung- mit einer niedrigeren Rate invasiver Infektionen wie nekrotisierenden Enterocolitiden und damit einer niedrigeren Mortalität assoziiert ist [66]. Diese Beobachtungen unterstützen die

Annahmen, dass die Nahrungszusammensetzung tatsächlich ein relevanter Faktor in der Entwicklung sehr kleiner Frühgeborener ist. Die Darmflora, das *bakterielle Mikrobiom*, rückte in den vergangenen Jahren zunehmend ins Zentrum der Forschung und gilt heute als eines der Forschungsfelder mit der meisten Dynamik [94]. Ihre Zusammensetzung ist von multiplen Faktoren wie *Ernährung und Medikamenteinnahme* abhängig. Auch *genetische Faktoren* sind relevant. Bonder et. al konnten 2017 multiple DNA Loci identifizieren, die Einfluss auf das Mikrobiom haben. Hierzu zählt auch der LP determinierende MCM6/LCT Locus. Bei dessen Vorliegen konnte eine erhöhte Rate an Bifidusbakterien nachgewiesen werden. Da in weiteren Studien eine erhöhte Rate an Bifidusbakterien zu einer niedrigeren NEC-Rate bei Frühgeborenen führte [62], stellte sich uns folglich die Frage, ob die LP zu einer niedrigeren Rate abdomineller Komplikationen führt. Eine solche Assoziation konnte in unserer Studie nicht nachgewiesen werden.

## 4.3 Wachstum

Wachstumsstörungen während der frühen Kindheit, in Zeiten substantieller zellulärer Hyperplasie und Hypertrophie, können zu dauerhaften Schäden führen. Frühgeborene haben sowohl in der postnatalen stationären Krankenhausversorgung als auch im weiteren Verlauf ein deutlich erhöhtes Risiko für Wachstumsstörungen. Sie sind zum Zeitpunkt ihrer Entlassung aus der stationären Krankenhausversorgung häufig signifikant untergewichtig. Bei Entlassung haben sie weiterhin ein erhöhtes Ernährungsrisiko und bedürfen engmaschiger Nachkontrollen bezüglich ihres Körperwachstums [95].

### 4.3.1 Kopfumfang

Der kindliche Kopfumfang bei Geburt eines deutschen Kindes beträgt den Perzentilenkurven des Robert-Koch-Instituts zufolge im Median 35,4 cm (Jungen) bzw. 34,7 cm (Mädchen). [70] In der Literatur wurde vielfach eine Korrelation von Kopfumfang und neurologischem Outcome beschrieben. So diskutierten Roth et al. bereits vor 20 Jahren den kindlichen Kopfumfang als frühzeitigen Indikator für eine spätere kognitive Schwäche [96]. Laut Singer ließe der Kopfumfang auf die extrauterine Großhirnentwicklung schließen und ein unterdurchschnittlicher Kopfumfang ist laut Hack et al. mit schlechterem neurologischen Outcome assoziiert [69,97]. Der KU der Neugeborenen unserer Studienpopulation liegt mit durchschnittlich 25,78 cm  $\pm$  2,61 cm unterhalb des Medians,

auch deutlich unterhalb der 3. Perzentile. Die Frühgeburtlichkeit ist hierfür der ausschlaggebende Faktor. Eine vergleichbare Kohorte deutscher VLBL Frühgeborener wurde 2006 von Trebar et al. untersucht. Bei einem leicht höheren durchschnittlichen GA der Kinder im Vergleich zu unserer Studienpopulation (29,17 Wochen, SD 2,79 Wochen vs. 28,80 Wochen, SD 2,68) betrug die Differenz des KU bei Geburt 25,78 cm in unserer Population vs. 26,60 cm. Da diese Differenz auf das leicht erhöhte GA zurückzuführen ist, fügen sich unsere Ergebnisse gut in das bestehende Bild ein. Es fehlte bisher an repräsentativen Daten bezüglich des Kopfumfangswachstums im stationären Verlauf, diese Lücke kann im Rahmen dieser Studie nun geschlossen werden. In unserer repräsentativen Kohorte betrug das tägliche Kopfumfangswachstum während des stationären Verlaufs  $0,10 \pm 0,06$  cm. Stellt man nun einen Vergleich an bezüglich der LP/LNP Träger, so findet sich keine Differenz. Hervorzuheben ist jedoch, dass das durchschnittliche extrauterine KU-Wachstum der Frühgeborenen nur minimal geringer ist als das intrauterine KU-Wachstum desselben GA. (bei Entlassung  $32,69 \pm 2,27$ cm, GA 38,66 Wochen, laut WHO GA 38 Wochen: 33,2 cm 50. Perzentile, 32,4 cm 25. Perzentile) [98].

### 4.3.2 Körperlänge

Das Ausmaß des Längenwachstums eines Kindes während der Kindheit ist abhängig von *Ernährung, Körpergröße der Eltern und individuell genetischen Faktoren*. Betrachtet man genetische Faktoren, so konnten bisher schon mehrere SNPs identifiziert werden, die mit der Körperlänge zu korrelieren scheinen [99]. *Trophologische Faktoren*, und hierbei insbesondere die Calcium- sowie die Proteinzufuhr während der Wachstumsphasen, haben einen bedeutenden Einfluss auf das Längenwachstum [100]. Wie bereits diskutiert, erfolgt ein Großteil der Calciumversorgung über Milchprodukte. Da das Längenwachstum der Knochen von der Verfügbarkeit der benötigten Knochenbestandteilen abhängig ist, ist der Wachstumsprozess demzufolge unter anderem von der Aufnahme von Milchprodukten abhängig. Milchkonsum soll einen stimulierenden Effekt auf das Längenwachstum haben, dies wurde schon im frühen 19. JH beschrieben [101]. Besonders interessant sind diese Erkenntnisse im Bezug auf VLBW Frühgeborene. Es wurde bereits beschrieben, dass diese im Alter von 20 Jahren eine doppelt so hohe Wahrscheinlichkeit haben, eine Körperlänge unter der 3. Perzentile zu haben [102]. Auf Grund des erhöhten Risikos für ein schlechteres Wachstum ist eine engmaschige Beobachtung und ggf. frühzeitige Intervention essentiell für ein langfristig adäquates Körperwachstum. Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Zusammenhang zwischen dem LP-Polymorphismus, dem damit einhergehenden erhöhten

Milchkonsum und der Größe im Alter von 5 Lebensjahren ermittelt werden. Die von Almon et al. beschriebene Korrelation [87] konnte im Rahmen dieser Studie nicht nachvollzogen werden, es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Körpergröße der Kinder und dem Ausmaß des Milchkonsums. Ursächlich hierfür könnte der Zeitpunkt der Follow-up Untersuchung sein. Hypothetisch könnten die Kinder im Alter von fünf Jahren zumindest teilweise über eine noch ausreichend erhöhte Laktase Synthese verfügen, sodass sich die Ernährungsgewohnheiten noch nicht gewandelt haben. Unterschieden wurde in unserer Studienkohorte in SGA und AGA geborene Kinder (appropriate for gestational age).

### 4.3.3 Körpergewicht

GG und KL sind wichtige Parameter und bedeutende Einflussfaktoren für die postnatale Entwicklung eines Kindes. Diese Parameter sind jedoch maßgeblich durch *maternale Faktoren während der Schwangerschaft*, beispielsweise Gewicht und Gewichtszunahme der Mutter, Drogenabusus oder Krankheiten, beeinflusst [103]. Es ist folglich relevant, die Wachstumsparameter im Verlauf zu beobachten und zu beurteilen.

Hartwig et al führten 2016 eine Metaanalyse an einer 2.843 starken brasilianischen Kohorte durch. Es ließ sich eine *positive Korrelation zwischen LP, erhöhtem Milchkonsum, erhöhtem BMI und Übergewicht* feststellen. In einer Studie an Kindern portugiesischen Ursprungs konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden, es wurde jedoch eine Korrelation zwischen *Bauchumfang und LP* nachgewiesen werden [104]. Wir erwarteten eine ähnliche Korrelation in unserer Studiengruppe. Und tatsächlich lässt sich nach fünf Lebensjahren ein signifikanter Unterschied in der Gewichtsentwicklung der Kinder mit und ohne LP feststellen. Wie in Tabelle 12 dargestellt, weisen jedoch entgegen unserer Erwartung *Lak-Kinder ein höheres Gewicht* auf. Wurde bisher davon ausgegangen, dass der Polymorphismus im fortgeschrittenen Alter am ehesten zu einer Gewichtserhöhung führt, so trifft das Gegenteil zu. Zunächst erscheint eine solche Relation nicht plausibel, insbesondere, da sich die Ergebnisse konträr zu bisherigen Ergebnissen aus der Adipositas Forschung zeigen. Es existieren zahlreiche Studien, denen zufolge das Gen einen Risikofaktor für Übergewicht darstellt [104]. Eine mögliche Ursache hierfür ist der Unterschied in der Studienpopulationen. Die bisherigen Studien fokussierten sich auf erwachsene Populationen, während unzureichend der Zusammenhang von LP Polymorphismus und kindlichem Gewicht untersucht wurde. Das Nahrungsverhalten in unterschiedlichen Lebensabschnitten variiert stark. Möglicherweise greifen Erwachsene

und Kinder, die auf Grund ihrer LNP weniger Milchprodukte zu sich nehmen, jeweils auf verschiedene Alternativprodukte zurück. Es ist denkbar, dass Erwachsene statt milchproduktthaltiger Nahrung vermehrt kalorienärmere Nahrung und Getränke wie Wasser oder Kaffee konsumieren, während Kinder alternativ Getränke mit höherem Kaloriengehalt, wie Limonaden oder Eistees, zu sich nehmen. Durch das Robert-Koch-Institut wurde bereits beschrieben, dass deutsche Kinder übermäßig häufig ungesunde Nahrung zu sich nehmen [105], amerikanische Kinder entscheiden sich bei freier Wahl eher für hochprozentig fetthaltige Nahrungsmittel [106]. Die Nahrungsmittelwahl könnte daher eine Ursache für dieses Ergebnis sein.

Eine weitere Rolle könnte die Aufnahme von Kalzium im Kindesalter spielen. In den wenigen vorhandenen Studien an pädiatrischen Populationen zu diesem Zusammenhang finden sich Hinweise, dass eine erhöhte Aufnahme von Milch und vor allem Kalzium einen reziproken Einfluss insbesondere auf den Körperfettanteil bei Kindern hat. Eine 2013 erhobene US-amerikanischen Studie an gesunden Kindern zwischen 8 und 13 Jahren zeigte einen deutlichen inversen Zusammenhang zwischen Milchkonsum und BMI Perzentilen [107]. Auch wenn die Fallzahlen der amerikanischen Studie klein sind, so gibt es doch weitere Studien, die diese Hypothese unterstützen. Es wird wiederholt der Zusammenhang zwischen Kalziumaufnahme und BMI diskutiert. Hierzu zählt unter anderem eine longitudinale Studie von Skinner et al [108]. Insbesondere in Zeiten von Energierestriktion führte ein erhöhter Milchprodukt- und damit Kalziumkonsum zu einer Abnahme des Körperfettanteils [109]. Da Kinder während ihres körperlichen Wachstums einen überdurchschnittlich aktiven Stoffwechsel haben, ist ein Energiedefizit im Erwachsenenalter physiologisch auf Grund des mangelnden Verbrauchs deutlich unwahrscheinlicher. Mit diesem Ansatz ließen sich die konträren Zusammenhänge zwischen Gewicht und LP bei Kindern und Erwachsenen erklären. Für ein genaueres Verständnis der Ergebnisse dieser Studie sind jedoch weitere Daten unabdingbar. Für die Zukunft wäre eine langfristige Untersuchung der GNN-Kohorte wünschenswert, um den hier beobachteten Gewichtsverlauf nachvollziehen und einordnen zu können. Eine Untersuchung beispielsweise in der Jugend oder im jungen Erwachsenenalter könnte maßgebliche Hinweise geben, ob die hier aufgeführten Thesen sich auch in der langfristigen Entwicklung der Studienpopulation nachvollziehen lassen.

## 4.4 Neurokognitive Entwicklung

Ein besonders interessanter Aspekt in der Neonatologie ist die lang- und kurzfristige neurokognitive Entwicklung der Kinder. Die Neurokognition besteht aus einer komplexen Variation mentaler Funktion, bestehend aus *Aufmerksamkeit, Gedächtnis, Denkprozessen, Lernprozessen und Wahrnehmung*. Die kognitive Entwicklung von Vorschulkindern kann Vorhersagen über spätere schulische Leistungen treffen. Das daraus resultierende Humankapital ist ein wichtiger Pfeiler für Gesundheit und das Wohlergehen eines Individuums im weiteren Leben [23]. Zellproliferation, DNA Synthese, Neurotransmitter sowie Hormon Metabolismus werden durch Nährstoffaufnahme beeinflusst. Zudem ist die Gehirnentwicklung in den frühen Lebensjahren überdurchschnittlich schnell im Vergleich zur Entwicklung des restlichen Körpers. Daher ist der junge Körper anfälliger für langfristige Folgen einer Fehlernährung [110]. Dieser Aspekt ist auf Grund der Unreife der Frühgeborenen bei Geburt in unserer Studie von besonderer Bedeutung.

Der durchschnittliche *IQ* der Kinder mit LPG lag in dieser Studie bei der Follow-Up Untersuchung im Alter von fünf Jahren bei 97,40 Punkten, die Differenz zu LNP betrug bei einem Wert von 97,20 lediglich 0,2 Punkte und war somit nicht signifikant. Selbiges gilt für das Vorliegen einer Cerebralparese (6,6% vs. 4,8%, gesamt 5,1%) oder eines  $IQ < 85$  (14,3% vs. 14,8%, gesamt 14,4%). In der Frühchen-Studie EpiPage aus Großbritannien erfolgte ebenfalls eine neurokognitive Nachuntersuchung im Alter von fünf Jahren. Die Rate an *Cerebralparesen* betrug in der Studie 9%, lag also 3,9 % höher in unserer Arbeit. Betroffen von Intelligenzminderung ( $IQ < 85$ ) waren 32% der Probanden, also nahezu doppelt so viele Kinder wie in unserer Studie. Eine mögliche Inkongruenz der Daten könnte durch das im Mittel unreifere Patientenkollektiv (GA 22-32 Wochen) begründet sein. Die hier erwähnte Inkongruenz geht auf die bereits diskutierte komplexe Einteilung der Frühgeborenen zurück. Erfreulich wäre, wenn für das bessere Outcome unseres Kollektivs auch die medizinische Entwicklung in den letzten Jahren relevant wäre [111]. Die Ernährung eines Kindes von der Geburt bis ins junge Erwachsenenalter spielt eine wichtige Rolle in Bezug auf dessen neurokognitive Entwicklung.

In dieser Studie konnte keine Assoziation zwischen Laktasepersistenz und dem neurokognitiven Outcome im Alter von 5 Jahren gefunden werden. Es wurde in früheren Studien bereits nachgewiesen, dass Bildungsnachteile bei sehr untergewichtigen Frühgeborenen bis ins junge Erwachsenenalter persistieren [102]. Es ist davon auszugehen, dass einerseits individuelle Faktoren wie das Auftreten von Komplikationen,

z.B. in Form von intrazerebralen Blutungen, und andererseits die Frühförderung und die elterliche Kapazität auf die besonderen Bedürfnisse eines frühgeborenen Kindes einzugehen den größten Einfluss auf die weitere neurokognitive Entwicklung haben. Eine ausgewogene Ernährung spielt in der Entwicklung wie in jeder Kindesentwicklung eine relevante Rolle, das LPG hat jedoch keinen selektiven Vor- oder Nachteil.

## 4.5 Stärken und Limitationen der Studie

In dieser Arbeit wurde im Rahmen der GNN Studie eine umfangreiche Kohorte von 11.602 Frühgeborenen untersucht. Bei der „German Neonatal Network“ Studie handelt es sich um die größte Frühgeborenen Kohortenstudie deutschlandweit, die auch im internationalen Vergleich zu einer der größten Frühgeborenen-Studien zählt. Jährlich werden über 2.000 Frühgeborene aus über 50 deutschlandweiten Perinatalzentren eingeschlossen, sodass geographische und Standort bedingte Unterschiede angeglichen werden. Ein multizentrischer, prospektiver Studienaufbau gewährleistet die hohe Validität der Studie. Die experimentelle Arbeit im studieneigenen Labor kann auf eine DNA Bank von >13.000 DNA Proben von Frühgeborenen <1500 g zugreifen und ist somit eine der umfangreichsten Frühgeborenen DNA-Banken weltweit. Im Rahmen dieser Arbeit konnte DNA von 11.602 Kindern erfolgreich genotypisiert werden. Das verwendete PCR-Verfahren und anschließende allelische Diskriminierung mittels TaqMan Technologie verfügt auf Grund seiner Standardisierung über eine hohe Reproduzierbarkeit und Validität [112,113].

Die als Endpunkte formulierten klinischen Items und die angewandten Tests und Erhebungsbögen sind standardisiert und gemäß der Empfehlungen der deutschen Fachgesellschaften für die Nachuntersuchung von Frühgeborenen an großen Gruppen von gesunden Kindern validiert. Dies reduziert Verzerrungen wie Recall- oder Selektionsbias und gewährleistet eine hohe Datenqualität, entspricht somit gängigen wissenschaftlichen Qualitätskriterien. Als Limitationen im Studienaufbau sind der nicht erfolgte Einschluss potentieller Probanden zu nennen. Die Einwilligung zur Studienteilnahme übersteigt in der Peripartalzeit bei einigen Eltern die emotionalen Kapazitäten, sodass keine Einwilligung erfolgt. Ein weiterer Grund für mangelnden Einschluss trotz vorliegender Einwilligung der Eltern stellten die fehlerhafte oder noch ausstehende DNA Isolierung dar. Die 5-Jahres-Nachuntersuchung bezieht sich auf eine geringere Fallzahl. Der wichtigste Grund hierfür ist das Alter der Kinder. Die meisten in das GNN eingeschlossenen Patienten waren zum

Zeitpunkt dieser Untersuchung noch keine fünf Jahre alt. Weitere Gründe für eine fehlende Follow-up Untersuchung ist das eine Bereitschaft der Eltern an einer Folgeuntersuchung teilzunehmen, Terminunpässlichkeiten sowie Umzug, Krankheit oder Tod.

Die Einschlusskriterien der vorliegenden Studienkohorte der VLBW-Frühgeborenen orientierten sich primär am GG, das  $GA < 37$ . SSW ist durch das Gewicht bedingt und somit als Kriterium nur sekundär relevant. Jegliche VLBW-Kohorte ist sehr heterogen, da es zu einer übermäßigen Repräsentation hypotroph geborener Kinder kommt [114]. Trotz dieser potenziellen Verzerrung wird diese Einteilung in der Literatur bevorzugt und auch in dieser Arbeit angewendet.

Der Verlust der Milchverträglichkeit beginnt zwischen zwei und zehn Lebensjahren [34]. Die Varianz des Zeitpunktes scheint unter anderem herkunftsbedingt zu sein. Einer Studie von Troelsen et al zufolge beginnt die Herabregulierung der Enzymaktivität bei thailändischen und chinesischen Kindern etwa im Alter von zwei Jahren, wohingegen Kinder finnischen Ursprungs erst ab der Jugend Laktose nicht mehr verwerten können [115]. Man geht davon aus, dass der Abfall der Enzymaktivität das Abstillen unterstützt [26]. Ein Großteil der Studien geht jedoch von einem Beginn des Verlustes um das fünfte Lebensjahr aus [116]. Die Nachuntersuchung unserer Studienteilnehmer erfolgte im Alter von fünf Jahren. Folglich gilt es zu diskutieren, ob die genetische Variante zu diesem Zeitpunkt bereits zu einem veränderten Nahrungsverhalten geführt haben könnte. Von besonderer Bedeutung hierbei könnte bisherigen Kenntnissen zufolge der Prozess der epigenetischen Alterung sein. Frühgeborene sind vor allem in den ersten Wochen ihres Lebens auf neonatologischen Intensivstationen extremem unphysiologischen Umweltstress ausgesetzt. Schlafmangel, Licht, Lärm, fehlender menschlicher Kontakt und Schmerzen [117] führen zu erhöhten Cortisolspiegeln bei Frühgeborenen. Erhöhte Glukokortikoidspiegel führen zu beschleunigter epigenetischer Alterung [118]. Folglich ist davon auszugehen, dass Frühgeborene in dieser sensiblen Entwicklungsphase epigenetisch schneller altern. Diese Hypothese konnte bereits an Endothelzellen im Nabelschurblut Frühgeborener nachgewiesen werden, die dadurch ein höheres kardiovaskuläres Risiko im späteren Leben tragen [119,120]. Neuesten Studien zufolge spielt die epigenetische Alterung auch bei der Ausprägung der LP eine große Rolle [121,122].

## 4.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Mit dieser multizentrischen prospektiven Studie an einer Kohorte VLBW Frühgeborener konnten repräsentative Aussagen zur Assoziation zwischen Laktasepersistenz und der kurz- und langfristigen kindlichen Entwicklung getroffen werden. Wissen um genetische, soziale und klinische Einflussfaktoren kann langfristig die Prognose Frühgeborener verbessern.

Obwohl die Laktasepersistenz beim Menschen mit einem geschätzten Selektionsvorteil von 4-5% pro Generation zu den in den letzten 10000 Jahren der Evolution am stärksten selektierten genetischen Regionen gehört [26], konnten in der vorliegenden Arbeit keine vorteilhafteren Verläufe bei Frühgeborenen mit Laktasepersistenz nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis unterstützt Daten aus einer aktuellen Erwachsenenstudie, in der ebenfalls keine protektiven Effekte der Laktasepersistenz nachgewiesen werden konnten [123].

Unsere Daten weisen darauf hin, dass LNP zumindest in der mittelfristigen kindlichen Entwicklung einen Vorteil für die Gewichtszunahme darstellt. In zukünftigen Arbeiten sollte der Zusammenhang zwischen LNP und Gewichtszunahme insbesondere im höheren Lebensalter weiter nachvollzogen werden. Diese Arbeit konnte einen Beitrag zur Diskussion um die frühkindliche Ernährung leisten.

Die Kohortenstärke dieser Arbeit ist groß, sodass die vorliegenden Ergebnisse statistisch eine hohe Validität haben. Zukünftig wäre eine Nachuntersuchung dieser Kohorte zu einem späteren Zeitpunkt, beispielsweise in der Jugend, sinnvoll, um in dieser Arbeit gewonnene Erkenntnisse in die langfristige Entwicklung einordnen zu können. Der Überlegung, insbesondere den Polymorphismus der Laktasepersistenz für die Weiterentwicklung personalisierter Medizin in der Neonatologie zu nutzen, konnte nur bedingt Rechnung getragen werden. Jedoch reiht sich diese Arbeit ein in eine Vielzahl von Studien, die das langfristige Ziel der Optimierung der personalisierten neonatologischen Medizin haben. Es gilt, in Zukunft weitere Faktoren zu identifizieren, die die langfristige Entwicklung dieses sensiblen Patientenkollektivs verbessern.

Bei zukünftig durchgeführten Studien zur Ernährung könnte es sinnvoll sein, zusätzlich zu Polymorphismen Informationen über das Ernährungsverhalten der Probanden zu erheben, um mögliche Assoziationen besser beurteilen zu können.

Diese und aktuelle Studien zeigen die Notwendigkeit auf, in großen Kohortenstudien mit Hilfe Sequenz basierter Ansätze genetische Risikofaktoren zu identifizieren und damit eine Präzisionsmedizin zu ermöglichen.

## 5 Zusammenfassung

**Fragestellung:** Die vorliegende Arbeit untersucht den Zusammenhang zwischen der kurz- und langfristigen Entwicklung „Very-Low-Birth-Weight“ Frühgeborener und dem Vorliegen einer Laktasepersistenz. Dabei handelt es sich um eine genetischen Variation, die mit einer besseren Verträglichkeit von Milch assoziiert ist. Der Polymorphismus rs4988235 führt zu einer fortlaufenden Expression des Enzyms Laktase über das Kleinkindalter hinaus. Folge ist die Fähigkeit, Laktose, das Disaccharid in Milch, zu verdauen und somit als Nahrungsmittel auch im Erwachsenenalter zu verwerten. Ziel dieser Arbeit war die Identifikation eine mögliche Assoziation zwischen diesem Single Nukleotid Polymorphismus und einem besseren Wachstum, einer günstigeren neurokognitiven Entwicklung und/oder einer niedrigeren Rate an abdominalen Operationen.

**Patienten und Methoden:** Es wurde genetisches Material von 11.602 Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht <1500g ausgewertet. Zur in-vitro Vervielfältigung von DNA-Strängen wurde die PCR Methode genutzt. Anschließend erfolgte die allelische Diskriminierung und die Bildung dichotomer Kohorten, die das Kollektiv in Laktase-Persistente (Lak+) und Laktase-Nonpersistente (Lak-) unterteilte. Diese Kohorten wurden binär verglichen im Bezug auf valide Marker für die kurz- und langfristige Entwicklung der Kinder. Die kurzfristige Entwicklung wurde postnatal in den Geburtskliniken mittels standardisierter Fragebögen erhoben. Zur Ermittlung der langfristigen Parameter wurde im Alter von fünf Jahren eine klinische Follow-up-Studie durchgeführt, in der das Wachstum sowie die kognitive Entwicklung erfasst wurden.

**Ergebnisse:** Das Gen hat keinen Einfluss auf anthropometrische Variablen bei der Geburt. Lak+ Kinder entwickeln sich auch in den ersten Lebenswochen nicht anders als Lak-Frühgeborene. Laktase-Nonpersistenz war mit einem höherem Body Maß Index im Alter von fünf Jahren assoziiert. Der Polymorphismus hat keinen signifikanten Einfluss auf die kognitive Entwicklung oder die Körpergröße im Alter von fünf Jahren.

**Diskussion:** Im Gegensatz zur Ausgangshypothese hatten Frühgeborene ohne Laktasepersistenz im Alter von 5 Jahren ein höheres Körpergewicht und einen höheren BMI. Dieses Ergebnis sollte in einer größeren Kohorte überprüft werden, da Frühgeborene häufig unter Wachstumsstörungen und einem zu niedrigen Körpergewicht leiden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller AB, Narwal R, Adler A, Vera Garcia C, Rohde S, Say L, Lawn JE: 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*. 2012;379(9832):2162–72.
2. Howson CP, Kinney M V, McDougall L, Lawn JE: Born Too Soon: Preterm Birth matters: *Reprod Health*. 2013;10(Suppl 1):S1-9.
3. Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn JE, Rudan I, Campbell H, Cibulskis R, Li M, Mathers C, Black RE: Global, regional, and national causes of child mortality: An updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000: *Lancet*. 2012;379(9832):2151–61.
4. Chawanpaiboon S, Vogel JP, Moller AB, Lumbiganon P, Petzold M, Hogan D, Landoulsi S, Jampathong N, Kongwattanakul K, Laopaiboon M, Lewis C, Rattanakanokchai S, Teng DN, Thinkhamrop J, Watananirun K, Zhang J, Zhou W, Gülmezoglu AM: Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis: *Lancet Glob Heal*. 2019;7(1):e37–46.
5. Battaglia FC, Lubchenco LO: A practical classification of newborn infants by weight and gestational age: *J Pediatr*. 1967;7(2):159–63.
6. Voigt M, Rochow N, Schneider KTM, Hagenah H-P, Scholz R, Hesse V, Wittwer-Backofen U, Straube S, Olbertz D: Neue Perzentilwerte für die Körpermaße neugeborener Einlinge : Ergebnisse der deutschen Perinatalerhebung der Jahre 2007 – 2011 unter Beteiligung aller 16 Bundesländer: *Z Geburtshilfe Neonatol*. 2014;218:210–7.
7. Gibson AT: Outcome following preterm birth: *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2007;21(5):869–82.
8. Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, Shankaran S, Laptook AR, Walsh MC, Hale EC, Newman NS, Schibler K, Carlo WA, Kennedy KA, Poindexter BB, Finer NN, Ehrenkranz RA, Duara S, Sánchez PJ, O’Shea TM, Goldberg RN, Van Meurs KP, Faix RG, Phelps DL, Frantz ID, Watterberg KL, Saha S, Das A, Higgins RD: Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network: *Pediatrics*. 2010;126(3):443–56.
9. Costeloe KL, Hennessy EM, Haider S, Stacey F, Marlow N, Draper ES: Short term outcomes after extreme preterm birth in England: Comparison of two birth cohorts in 1995 and 2006 (the EPICure studies): *BMJ*. 2012;345(7886).
10. Janevic T, Zeitlin J, Auger N, Egorova NN, Hebert P, Balbierz A, Howell EA: Association of Race/Ethnicity with Very Preterm Neonatal Morbidities: *JAMA Pediatr*. 2018;172(11):1061–9.
11. Marlow N: Keeping Up With Outcomes for Infants Born at Extremely Low Gestational Ages: *JAMA Pediatr*. 2015;26(3):E1–2.

12. Humberg A, Härtel C, Rausch TK, Stichtenoth G, Jung P, Wieg C, Kribs A, Von Der Wense A, Weller U, Höhn T, Olbertz DM, Felderhoff-Müser U, Rossi R, Teig N, Heitmann F, Schmidtke S, Bohnhorst B, Vochem M, Segerer H, Möller J, Eichhorn JG, Wintgens J, Böttger R, Hubert M, Dördelmann M, Hillebrand G, Roll C, Jensen R, Zemlin M, Mögel M, Werner C, Schäfer S, Schaible T, Franz A, Heldmann M, Ehlers S, Kannt O, Orlikowsky T, Gerleve H, Schneider K, Haase R, Böckenholt K, Linnemann K, Herting E, Göpel W: Active perinatal care of preterm infants in the German Neonatal Network: Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2019;105:F190-195.
13. Nordhov SM, Ronning JA, Ulvund SE, Dahl LB, Kaarensen PI: Early Intervention Improves Behavioral Outcomes for Preterm Infants: Randomized Controlled Trial: Pediatrics. 2012;129(1):e9–16.
14. Boyle EM, Poulsen G, Field DJ, Kurinczuk JJ, Wolke D, Alfirevic Z, Quigley MA: Effects of gestational age at birth on health outcomes at 3 and 5 years of age: Population based cohort study: BMJ. 2012;344(7848).
15. Crump C, Winkleby MA, Sundquist J, Sundquist K: Prevalence of Survival Without Major Comorbidities among Adults Born Prematurely: JAMA. 2019;322(16):1580–8.
16. Parkinson JRC, Hyde MJ, Gale C, Santhakumaran S, Modi N: Preterm Birth and the Metabolic Syndrome in Adult Life: A Systematic Review and Meta-analysis: Pediatrics. 2013;131(4):e1240–63.
17. Lindström K, Winbladh B, Haglund B, Hjern A: Preterm infants as young adults: A Swedish national cohort study: Pediatrics. 2007;120(1):70–7.
18. Moster D, Lie RT, Markestad T: Long-term medical and social consequences of preterm birth: N Engl J Med. 2008;359(3):262–73.
19. Russell RB, Green NS, Steiner CA, Meikle S, Howse JL, Poschman K, Dias T, Potetz L, Davidoff MJ, Damus K, Petrini JR: Cost of hospitalization for preterm and low birth weight infants in the United States: Pediatrics. 2007;120(1):e1-9.
20. Kirschner W, Halle H, Pogonke MA: Kosten der Früh- und Nichtfrühgeburten und die Effektivität und Effizienz von Präventionsprogrammen am Beispiel von BabyCare : Eine Schätzung auf der Grundlage der DRG unter Berücksichtigung der Primäraufnahmen in der Neonatologie: Präy Gesundheitsf. 2009;4(1):41–50.
21. Fields DA, Demerath EW: Human Milk composition: nutrients and bioactive factors: Pediatr Obes. 2012;7(4):304–12.
22. Oftedal OT: The evolution of milk secretion and its ancient origins: Animal. 2012;6(3):355–68.
23. Nyaradi A, Li J, Hickling S, Foster J, Oddy WH: The role of nutrition in children’s neurocognitive development, from pregnancy through childhood: Front Hum Neurosci. 2013;7:1–16.
24. Atkinson SA, Bryan H, Anderson H: Human milk feeding in premature infants: Protein, fat, and carbohydrate balances in the first two weeks of life: J Pediatr. 1981;99(4):617–24.
25. Heine RG, Alrefae F, Bachina P, De Leon JC, Geng L, Gong S, Madrazo JA, Ngamphaiboon J, Ong C, Rogacion JM: Lactose intolerance and gastrointestinal cow’s milk allergy in infants and children – common misconceptions revisited: World Allergy Organ J. 2017;10(41):1–8.

26. Misselwitz B, Butter M, Verbeke K, Fox MR: Update on lactose malabsorption and intolerance: Pathogenesis, diagnosis and clinical management: *Gut*. 2019;68(11):2080–91.
27. Séguérel L, Bon C: On the Evolution of Lactase Persistence in Humans: *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2017;18(1):297–319.
28. Troelsen JT, Olsen J, Møller J, Sjöström H: An Upstream Polymorphism Associated with Lactase Persistence has Increased Enhancer Activity: *Gastroenterology*. 2003;125(6):1686–94.
29. Wang Y, Harvey CB, Hollox EJ, Phillips AD, Poulter M, Clay P, Walker-Smith JA, Swallow DM: The genetically programmed down-regulation of lactase in children: *Gastroenterology*. 1998;114(6):1230–6.
30. Sahi T, Isokoski M, Jussila J, Launiala K: Lactose malabsorption in Finnish children of school age: *Acta Paediatr Scand*. 1972;61:11–6.
31. Gerbault P, Liebert A, Itan Y, Powell A, Currat M, Burger J, Swallow DM, Thomas MG: Evolution of lactase persistence: an example of human niche construction: *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2011;366(1566):863–77.
32. Mattar R, Mazo DF de C, Carrilho FJ: Lactose intolerance: Diagnosis, genetic, and clinical factors: *Clin Exp Gastroenterol*. 2012;5(1):113–21.
33. Burger J, Kirchner M, Bramanti B, Haak W, Thomas MG: Absence of the lactase-persistence-associated allele in early Neolithic Europeans: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(10):3736–41.
34. Jones V: Lactose intolerance in young children and their parents: *Am J Clin Nutr*. 1974;(June):547–9.
35. Itan Y, Jones BL, Ingram CJE, Swallow DM, Thomas MG: A worldwide correlation of lactase persistence phenotype and genotypes: *BMC Evol Biol*. 2010;10:36.
36. Scrimshaw N, Murray E: The acceptability of milk and milk products in populations with a high prevalence of lactose intolerance: *Am J Clin Nutr*. 1988;(27):1142–59.
37. Enattah NS, Kuokkanen M, Forsblom C, Natah S, Oksanen A, Järvelä I, Peltonen L, Savilahti E: Correlation of intestinal disaccharidase activities with the C/T-13910 variant and age: *World J Gastroenterol*. 2007;13(25):3508–12.
38. Enattah NS, Sahi T, Savilahti E, Terwilliger JD, Peltonen L, Järvelä I: Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia: *Nat Genet*. 2002;30(2):233–7.
39. Bersaglieri T, Sabeti PC, Patterson N, Vanderploeg T, Schaffner SF, Drake JA, Rhodes M, Reich DE, Hirschhorn JN: Genetic signatures of strong recent positive selection at the lactase gene: *Am J Hum Genet*. 2004;74(6):1111–20.
40. Lukito W, Malik SG, Surono IS, Wahlqvist ML: From “lactose intolerance” to “lactose nutrition”: *Asia Pac J Clin Nutr*. 2015;24(December):S1–8.
41. Cavalli-Sforza LL: Analytic review: some current problems of human population genetics: *Am J Hum Genet*. 1973;25(1):82–104.
42. Poulter M, Hollox E, Harvey CB, Mulcare C, Peuhkuri K, Kajander K, Sarner M, Korpela R, Swallow DM: The causal element for the lactase persistence/non-persistence polymorphism is located in a 1 Mb region of linkage disequilibrium in Europeans: *Ann Hum Genet*. 2003;67(4):298–311.

43. Krüttli A, Bouwman A, Akgül G, Casa P Della, Rühli F, Warinner C: Ancient DNA analysis reveals high frequency of european lactase persistence allele (T-13910) in medieval Central Europe: PLoS One. 2014;9(1):e86251.
44. Tishkoff SA, Reed FA, Ranciaro A, Voight BF, Courtney C, Silverman JS, Powell K, Mortensen HM, Hirbo JB, Ibrahim M, Omar SA, Lema G, Nyambo TB, Bumpstead S, Pritchard JK, Wray GA: Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe: Nat Genet. 2007;39(1):31–40.
45. Sabri Enattah N, Trudeau A, Pimenoff V, Maiuri L, Auricchio S, Greco L, Rossi M, Lentze M, Seo JK, Rahgozar S, Khalil I, Alifrangis M, Natah S, Groop L, Shaat N, Kozlov A, Verschubskaya G, Comas D, Bulayeva K, Qasim Mehdi S, Terwilliger JD, Sahi T, Savilahti E, Perola M, Sajantila A, Järvelä I, Peltonen L: Evidence of Still-Ongoing Convergence Evolution of the Lactase Persistence T -1 3 9 1 0 Alleles in Humans: Am J Hum Genet. 2007;81:615–25.
46. Mulcare CA, Weale ME, Jones AL, Connell B, Zeitlyn D, Tarekegn A, Swallow DM, Bradman N, Thomas MG: The T allele of a single-nucleotide polymorphism 13.9 kb upstream of the lactase gene (LCT) (C-13.9kbT) does not predict or cause the lactase-persistence phenotype in Africans: Am J Hum Genet. 2004;74(6):1102–10.
47. Newcomer AD, McGill DB, Thomas PJ, Hofmann AF: Prospective Comparison of indirect methods for detecting lactase deficiency: N Engl J Med. 1975;293:1232–6.
48. Obermayer-Pietsch BM, Bonelli CM, Walter DE, Kuhn RJ, Fahrleitner-Pammer A, Berghold A, Goessler W, Stepan V, Dobnig H, Leb G, Renner W: Genetic predisposition for adult lactose intolerance and relation to diet, bone density, and bone fractures: J Bone Miner Res. 2004;19(1):42–7.
49. Coluccia E, Iardino P, Pappalardo D, Brigida AL, Formicola V, De Felice B, Guerra C, Pucciarelli A, Amato MR, Riegler G, De Magistris L: Congruency of genetic predisposition to lactase persistence and lactose breath test: Nutrients. 2019;11(6):1–8.
50. Raby BA, Slavotinek A, Tirnauer JS: Overview of genetic variation: In: <https://www.uptodate.com/contents/overview-of-genetic-variation>. 2019 [cited 2020 Mar 16].
51. Zschockem J: Mutationen und genetische Variabilität: In: Schaaf CP, Zschockem J, editors. Basiswissen Humangenetik, Auflage 3, 43. Berlin: Springer; 2018.
52. Erichsen HC, Chanock SJ: SNPs in cancer research and treatment: Br J Cancer. 2004;90(4):747–51.
53. Cao H, Duan J, Lin D, Calhoun V, Wang YP: Integrating fMRI and SNP data for biomarker identification for schizophrenia with a sparse representation based variable selection method: BMC Med Genomics. 2013;6(SUPPL. 3):S2.
54. Klein R: SNP-Typisierung in der forensischen Genetik unter Berücksichtigung der Analyse von degradiertes DNA: Med Diss Ulm, 2007.
55. Boll W, Wagner P, Mantei N: Structure of the chromosomal gene and cDNAs coding for lactase-phlorizin hydrolase in humans with adult-type hypolactasia or persistence of lactase: Am J Hum Genet. 1991;48(5):889–902.

56. Mantei N, Villa M, Enzler T, Wacker H, Boll W, James P, Hunziker W, Semenza G: Complete primary structure of human and rabbit lactase-phlorizin hydrolase: implications for biosynthesis, membrane anchoring and evolution of the enzyme: *EMBO J.* 1988;7(9):2705–13.
57. Husain I, Sancar A, Hill C: The human  $\beta$ -globin gene contains a downstream developmental specific enhancer: *Nucleic Acids Res.* 1987;15(3):1281–95.
58. Goldhamer DJ, Brunk BP, Faerman A, King A, Shani M, Emerson CP: Embryonic activation of the myoD gene is regulated by a highly conserved distal control element: *Development.* 1995;121:637–49.
59. Grehan S, Tse E, Taylor JM: Two distal downstream enhancers direct expression of the human apolipoprotein E gene to astrocytes in the brain: *J Neurosci.* 2001;21(3):812–22.
60. Tishkoff SA, Reed FA, Ranciaro A, Voight BF, Courtney C, Silverman JS, Powell K, Mortensen HM, Hirbo JB, Ibrahim M, Omar SA, Lema G, Nyambo TB, Bumpstead S, Pritchard JK, Wray GA, Babbitt CC, Silverman JS, Powell K, Mortensen HM, Hirbo JB, Osman M, Ibrahim M, Omar SA, Lema G, Nyambo TB, Ghorji J, Bumpstead S, Pritchard JK, Wray GA, Deloukas P: Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe: *Nat Genet.* 2006;39(1):31–40.
61. Pfeuffer M, Schrezenmeier J: Milk and the metabolic syndrome: *Obes Rev.* 2007;8(2):109–18.
62. Bonder MJ, Kurilshikov A, Tigchelaar EF, Mujagic Z, Imhann F, Vila AV, Deelen P, Vatanen T, Schirmer M, Smeekens SP, Zhernakova D, Jankipersadsing SA, Jaeger M, Oosting M, Cenit MC, Masclee A, Swertz MA, Li Y, Kumar V, Joosten L, Harmsen H, Weersma RK, Franke L, Hofker MH, Xavier RJ, Jonkers D, Netea MG, Wijmenga C, Fu J, Zhernakova A: The effect of host genetics on the gut microbiome: *Nat Genet.* 2016;48(11):1407–12.
63. Yang Q, Lin SL, Au Yeung SL, Kwok MK, Xu L, Leung GM, Schooling CM: Genetically predicted milk consumption and bone health, ischemic heart disease and type 2 diabetes: A Mendelian randomization study: *Eur J Clin Nutr.* 2017;71(8):1008–12.
64. Asghari G, Yuzbashian E, Mirmiran P, Hooshmand F, Najafi R, Azizi F: Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) Dietary Pattern Is Associated with Reduced Incidence of Metabolic Syndrome in Children and Adolescents: *J Pediatr.* 2016;174:178-184.e1.
65. Friedrich DC, De Andrade FM, Fiegenbaum M, De Almeida SD, Mattevi VS, Callegari-Jacques SM, Hutz MH: The lactase persistence genotype is a protective factor for the metabolic syndrome: *Genet Mol Biol.* 2014;37(4):611–5.
66. Bühner C, Fischer HS, Wellmann S: Nutritional interventions to reduce rates of infection, necrotizing enterocolitis and mortality in very preterm infants: *Pediatr Res.* 2020;87(2):371–7.
67. Bax M, Goldstein M, Rosenbaum P, Leviton A, Paneth N, Dan B, Jacobsson B, Damiano D: Proposed definition and classification of cerebral palsy: *Dev Med Child Neurol.* 2005;47:571–6.
68. Palisano R, Rosenbaum P, Walter S, Russell D, Wood E, Galuppi B: Development and reliability of a system to classify gross motor function in children with cerebral palsy: *Dev Med Child Neurol.* 1997;39(2):214–23.

69. Singer D: Langzeitüberleben von Frühgeborenen: Bundesgesundheitsbl. 2012;55(4):568–75.
70. Neuhauser PDH, Schienkiewitz DA, Schaffrath Rosario A, Dortschy R, Kurth B-M: Referenzperzentile für anthropometrische Maßzahlen und Blutdruck: Studie zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland (KiGGs). Berlin; 2013.
71. Sherwell S, Reid SM, Reddihough DS, Wrennall J, Ong B, Stargatt R: Measuring intellectual ability in children with cerebral palsy: Can we do better? Res Dev Disabil. 2014;35(10):2558–67.
72. Zeitlin J, Szamotulska K, Drewniak N, Mohangoo AD, Chalmers J, Sakkeus L, Irgens L, Gatt M, Gissler M, Blondel B: Preterm birth time trends in Europe: A study of 19 countries: BJOG An Int J Obstet Gynaecol. 2013;120(11):1356–65.
73. Schlußner E: The prevention, diagnosis and treatment of premature labor: Dtsch Ärzteblatt Int. 2013;110(13):227–35.
74. Howson CP, Kinney M V., Lawn JE: Born too soon. The Global Action Report on Preterm Birth: Reprod Health. 2012;(Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births):1–126.
75. Offit K: The future of clinical cancer genomics: Semin Oncol. 2016;43(5):615–22.
76. Kettunen J, Silander K, Saarela O, Amin N, Müller M, Timpson N, Surakka I, Ripatti S, Laitinen J, Hartikainen AL, Pouta A, Lahermo P, Anttila V, Männistö S, Jula A, Virtamo J, Salomaa V, Lehtimäki T, Raitakari O, Gieger C, Wichmann EH, van Duijn CM, Smith GD, McCarthy MI, Jarvelin MR, Perola M, Peltonen L: European lactase persistence genotype shows evidence of association with increase in body mass index: Hum Mol Genet. 2010;19(6):1129–36.
77. Ingram CJE, Mulcare CA, Itan Y, Thomas MG, Swallow DM: Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence: Hum Genet. 2009;124(6):579–91.
78. Hollox EJ, Swallow DM: Lactase Deficiency: Biological and Medical Aspects of the Adult Human Lactase Polymorphism: In: King RA, Rotter JI, Motulsky AG, editors. The Genetic Basis of Common Diseases, Auflage 2, 250-265. Oxford: Oxford Univ. Press; 2002.
79. Leonardi M, Gerbault P, Thomas MG, Burger J: The evolution of lactase persistence in Europe. A synthesis of archaeological and genetic evidence: Int Dairy J. 2012;22(2):88–97.
80. Cox JA, Elliott FG: Primary adult lactose intolerance in the Kivu Lake area: Rwanda and the bushi: Am J Dig Dis. 1974;19(8):714–24.
81. Büning C, Ockenga J, Krüger S, Jurga J, Baier P, Dignass A, Vogel A, Strassburg C, Weltrich R, Genschel J, Lochs H, Schmidt H: The C/C(-13910) and G/G(-22018) genotypes for adult-type hypolactasia are not associated with inflammatory bowel disease: Scand J Gastroenterol. 2003;38(5):538–42.
82. Wuertz C, Gilbert P, Baier W, Kunz C: Cross-sectional study of factors that influence the 25-hydroxyvitamin D status in pregnant women and in cord blood in Germany: Br J Nutr. 2013;110(10):1895–902.
83. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R: Epidemiology and Causes of Preterm Birth: Lancet. 2008;29(1):6–7.

84. Marangoni F, Cetin I, Verduci E, Canzone G, Giovannini M, Scollo P, Corsello G, Poli A: Maternal Diet and Nutrient Requirements in Pregnancy and Breastfeeding. An Italian Consensus Document: *Nutrients*. 2016;8(10):629.
85. Hofmeyr GJ, Atallah AN, Duley L: Calcium supplementation during pregnancy for preventing hypertensive disorders and related problems: *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;(3):1–43.
86. Hartwig FP, Horta BL, Smith GD, De Mola CL, Victora CG: Association of lactase persistence genotype with milk consumption, obesity and blood pressure: A Mendelian randomization study in the 1982 Pelotas (Brazil) Birth Cohort, with a systematic review and meta-analysis: *Int J Epidemiol*. 2016;45(5):1573–87.
87. Lombardi-Boccia G, Aguzzi A, Cappelloni M, Di Lullo G, Lucarini M: Total-diet study: dietary intakes of macro elements and trace elements in Italy: *Br J Nutr*. 2007;90:1117–21.
88. Ota E, Haruna M, Suzuki M, Anh DD, Tho LH, Tam NTT, Thiem VD, Anh NTH, Isozaki M, Shibuya K, Ariyoshi K, Murashima S, Moriuchi H, Yanai H: Maternal body mass index and gestational weight gain and their association with perinatal outcomes in Vietnam: *Bull World Health Organ*. 2010;89(2):127–36.
89. Alberman E: Are our babies becoming bigger? *J R Soc Med*. 1991;84(5):257–60.
90. Olsen SF, Halldorsson TI, Willett WC, Knudsen VK, Gillman MW: Milk consumption during pregnancy is associated with increased infant size at birth : prospective cohort study 1 – 4: 2007;1104–10.
91. Moore VM, Davies MJ, Willson KJ, Worsley A, Robinson JS: Dietary composition of pregnant women is related to size of the baby at birth: *Am Soc Nutr Sci*. 2005;1196–201.
92. Kronenberg HM: Maternal-Fetal Calcium and Bone Metabolism During Pregnancy, Puerperium, and Lactation: 2015;18(2):832–72.
93. Pison G, Monden C, Smits J: Twinning Rates in Developed Countries: Trends and Explanations: *Popul Dev Rev*. 2015;41(4):629–49.
94. Schmidt TSB, Raes J, Bork P: The Human Gut Microbiome: From Association to Modulation: *Cell*. 2018;172(6):1198–215.
95. Ehrenkranz RA, Younes N, Lemons JA, Fanaroff AA, Donovan EF, Wright LL, Katsikiotis V, Tyson JE, Oh W, Shankaran S, Bauer CR, Korones SB, Stoll BJ, Stevenson DK, Papile LA: Longitudinal growth of hospitalized very low birth weight infants: *Pediatrics*. 1999;104(2):280–9.
96. Roth SC, Baudin J, Cady E, Johal K, Townsend JP, Wyatt JS, Reynolds EO, Stewart AL: Relation of deranged neonatal cerebral oxidative metabolism with neurodevelopmental outcome and head circumference at 4 years: Vol. 39, *Developmental medicine and child neurology*. 1997. p. 718–25.
97. Hack M, Breslau N, Weissman B, Aram D, Klein N, Borawski E: Effect of very low birth weight and subnormal head size on cognitive abilities at school age: *N Engl J Med*. 1991;325(4):231–7.

98. Kiserud T, Piaggio G, Carroli G, Widmer M, Carvalho J, Neerup Jensen L, Giordano D, Cecatti JG, Abdel Aleem H, Talegawkar SA, Benachi A, Diemert A, Tshefu Kitoto A, Thinkhamrop J, Lumbiganon P, Tabor A, Kriplani A, Gonzalez Perez R, Hecher K, Hanson MA, Gülmezoglu AM, Platt LD: The World Health Organization Fetal Growth Charts: A Multinational Longitudinal Study of Ultrasound Biometric Measurements and Estimated Fetal Weight: *PLoS Med.* 2017;14(1):e1002220.
99. van der Valk RJP, Kreiner-Moller E, Kooijman MN: A novel common variant in DCST2 is associated with length in early life and height in adulthood: *Hum Mol Genet.* 2015;24(4):1155–68.
100. Jelenkovic A, Sund R, Hur Y-M, Yokoyama Y, Hjelmberg J, Möller S, Honda C, Magnusson PKE, Pedersen NL, Ooki S, Aaltonen S, Stazi MA, Fagnani C, D'Ippolito C, Freitas DL, Maia JA, Ji F, Ning F, Pang Z, Rebato E, Busjahn A, Kandler C, Saudino KJ, Jang KL, Cozen W, Hwang AE, Mack TM, Gao W, Yu C, Li L, Corley RP, Huibregtse BM, Derom CA, Vlietinck RF, Loos RJJ, Heikkilä K, Wardle J, Llewellyn CH, Fisher A, McAdams TA, Eley TC, Gregory AM, He M, Ding X, Bjerregaard-Andersen M, Beck-Nielsen H, Sodemann M, Tarnoki AD, Tarnoki DL, Knafo-Noam A, Mankuta D, Abramson L, Burt SA, Klump KL, Silberg JL, Eaves LJ, Maes HH, Krueger RF, McGue M, Pahlen S, Gatz M, Butler DA, Bartels M, Van Beijsterveldt TCEM, Craig JM, Saffery R, Dubois L, Boivin M, Brendgen M, Dionne G, Vitaro F, Martin NG, Medland SE, Montgomery GW, Swan GE, Krasnow R, Tynelius P, Lichtenstein P, Haworth CMA, Plomin R, Bayasgalan G, Narandalai D, Harden KP, Tucker-Drob EM, Spector T, Mangino M, Lachance G, Baker LA, Tuvblad C, Duncan GE, Buchwald D, Willemsen G, Skytthe A, Kyvik KO, Christensen K, Öncel SY, Aliev F, Rasmussen F, Goldberg JH, Sørensen TIA, Boomsma DI, Kaprio J, Silventoinen K: Genetic and environmental influences on height from infancy to early adulthood: An individual-based pooled analysis of 45 twin cohorts: *Sci Rep.* 2016;6(June):1–13.
101. Almon R, Nilsson TK, Sjöström M, Engfeldt P: Lactase persistence and milk consumption are associated with body height in Swedish preadolescents and adolescents: *Food Nutr Res.* 2011;55:1–6.
102. Maureen Hack, Daniel J. Flannery, Mark Schluchter, Lydia Cartar, Elaine Borawski NK: Outcomes in Young Adulthood for Very-Low-Birth-Weight Infants: *N Engl J Med.* 2002;346(3):149–57.
103. Dunger DB, Ong KKL, Huxtable SJ, Sherriff A, Woods KA, Ahmed ML, Golding J, Pembrey ME, Ring S, Bennett ST, Todd JA: Association of the INS VNTR with size at birth: *Nat Genet.* 1998;18(3):231–6.
104. Albuquerque D, Nóbrega C, Manco L, Nóbrega C, Manco L: The lactase persistence -13910C>T polymorphism shows indication of association with abdominal obesity among Portuguese children: *Acta Paediatr Int J Paediatr.* 2013;102(4):153–7.
105. Rieck A: Ernährung: Studie zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland (KiGGs), 99-108. Berlin; 2008.
106. Kranz S, Lin PJ, Wagstaff DA: Children's Dairy Intake in the United States: Too Little, Too Fat? *J Pediatr.* 2007;151(6):642–6.
107. Gunther CW, Branscum P, Kennel J, Klein EG, Monnat LE, Kaye G: Examination of the Relationship of Dairy Product Consumption and Dietary Calcium with Body Mass Index Percentile in Children: *Int J Child Heal Nutr.* 2013;2(1):1–8.

108. Skinner JD, Bounds W, Carruth BR, Ziegler P: Longitudinal calcium intake is negatively related to children's body fat indexes: *J Am Diet Assoc.* 2003;103(12):1626-1631+1712.
109. Zemel MB, Richards J, Mathis S, Milstead A, Gebhardt L, Silva E: Dairy augmentation of total and central fat loss in obese subjects: *Int J Obes.* 2005;29(4):391-7.
110. Benton D: Vitamins and neural and cognitive developmental outcomes in children: *Proc Nutr Soc.* 2012;71(1):14-26.
111. Larroque B, Ancel PY, Marret S, Marchand L, André M, Arnaud C, Pierrat V, Rozé JC, Messer J, Thiriez G, Burguet A, Picaud JC, Bréart G, Kaminski M: Neurodevelopmental disabilities and special care of 5-year-old children born before 33 weeks of gestation (the EPIPAGE study): a longitudinal cohort study: *Lancet.* 2008;371(9615):813-20.
112. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH: Detection of Specific Polymerase Chain-Reaction Product By Utilizing the 5'-]3' Exonuclease Activity of *Thermus-Aquaticus* Dna-Polymerase: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(16):7276-80.
113. Bustin SA: Absolute quantification of mrna using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays: *J Mol Endocrinol.* 2000;25(2):169-93.
114. McLean FH, Usher RH, Arnold CC, Kramer MS, Hobbs CA: Very Low Birth Weight: A Problematic Cohort for Epidemiologic Studies of Very Small or Immature Neonates: *Am J Epidemiol.* 2017;134(6):604-13.
115. Troelsen JT: Adult-type hypolactasia and regulation of lactase expression: *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2005;1723(1-3):19-32.
116. Robayo-Torres CC, Nichols BL: Molecular differentiation of congenital lactase deficiency from adult-type hypolactasia: *Nutr Rev.* 2007;65(2):95-8.
117. Montirosso R, Del Prete A, Bellù R, Tronick E, Borgatti R: Level of NICU quality of developmental care and neurobehavioral performance in very preterm infants: *Pediatrics.* 2012;129(5):1-9.
118. Zannas AS, Arloth J, Carrillo-Roa T, Iurato S, Röh S, Ressler KJ, Nemeroff CB, Smith AK, Bradley B, Heim C, Menke A, Lange JF, Brückl T, Ising M, Wray NR, Erhardt A, Binder EB, Mehta D: Lifetime stress accelerates epigenetic aging in an urban, African American cohort: relevance of glucocorticoid signaling: *Genome Biol.* 2015;16(1):266.
119. Vassallo PF, Simoncini S, Ligi I, Chateau AL, Bachelier R, Robert S, Morere J, Fernandez S, Guillet B, Marcelli M, Tellier E, Pascal A, Simeoni U, Anfosso F, Magdinier F, Dignat-George F, Sabatier F: Accelerated senescence of cord blood endothelial progenitor cells in premature neonates is driven by SIRT1 decreased expression: *Blood.* 2014;123(13):2116-26.
120. Nilsson PM, McEniery CM: Early Vascular Aging in the Young: Influence of Birth Weight and Prematurity: In: Nilsson P, Olsen M, Laurent S, editors. *Early Vascular Aging (EVA)*, Auflage 1, 133-134. Elsevier Ltd; 2015.

121. Labrie V, Buske OJ, Oh E, Jeremian R, Ptak C, Gasiūnas G, Maleckas A, Petereit R, Žvirbliene A, Adamonis K, Kriukienė E, Koncevičius K, Gordevičius J, Nair A, Zhang A, Ebrahimi S, Oh G, Šikšnys V, Kupčinskas L, Brudno M, Petronis A: Lactase nonpersistence is directed by DNA-variation-dependent epigenetic aging: *Nat Struct Mol Biol.* 2016;23(6):566–73.
122. Kuchay RAH: New insights into the molecular basis of lactase non-persistence/persistence: a brief review: *Drug Discov Ther.* 2020;14(1):1–7.
123. Bergholdt HKM, Nordestgaard BG, Varbo A, Ellervik C: Lactase persistence, milk intake, and mortality in the Danish general population: a Mendelian randomization study: *Eur J Epidemiol.* 2018;33(2):171–81.
124. Hingorani AD, Shah T, Kumari M, Sofat R, Smeeth L: Science, medicine, and the future: Translating genomics into improved healthcare: *BMJ.* 2010;341(7781):1037–42.

## 7 Anhang

### 7.1 Liste der Kooperationspartner des GNN

**Aachen**, Universitätsklinikum Aachen, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Sektion Neonatologie

**Aschaffenburg**, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin

**Berlin**, Krankenhaus Neukölln, Vivantes, Kinderheilkunde und Jugendmedizin

**Bielefeld**, Evangelisches Krankenhaus Bielefeld, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin

**Bochum**, Kliniken der Ruhr-Universität Bochum, St. Elisabeth-Hospital

**Bonn**, St. Marienhospital Bonn, Neonatologie

**Bonn**, Universitätsklinikum, Neonatologie und pädiatrische Intensivstation

**Bremen**, Klinikum Links der Weser, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin

**Coesfeld**, Vincenz-Hospital, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Coesfeld

**Datteln**, Vestische Kinder- und Jugendklinik Datteln, Universität Witten/Herdecke

**Detmold**, Klinikum Lippe, Neonatologie und pädiatrische Intensivstation

**Dortmund**, Westfälisches Kinderzentrum Klinikum Dortmund

**Dresden**, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Neonatologie u. Intensivmedizin

**Düsseldorf**, Klinik für allg. Pädiatrie

**Düsseldorf**, Florence-Nightingale Krankenhaus, Neonatologie

**Eutin**, Kinderklinik Eutin, Ostholstein Kliniken

**Essen**, Universitätskinderklinik

**Flensburg**, Ev.-Luth. Diakonissenanstalt zu Flensburg, Zentrum für Gesundheit und Diakonie

**Frankfurt am Main**, Bürgerhospital Frankfurt am Main, Verein Frankfurter Stiftungskrankenhäuser e.V., Klinik für Neonatologie

**Freiburg**, Universitätsklinikum Freiburg, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin

**Göttingen**, Universitäts-Kinderklinik

**Greifswald**, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Ernst-Moritz-Arndt-Universität

**Halle**, Universitätsklinikum Halle (Saale), Klinik für Kinder- und Jugendmedizin

**Hamburg**, Altonaer Kinderkrankenhaus

**Hamburg**, Asklepios Klinik Barmbek, Neonatologie

- Hannover**, Kinderkrankenhaus auf der Bult
- Hannover**, Medizinische Hochschule Hannover, Kinderklinik I
- Heide**, Westküstenklinikum Heide, Klinik für Kinder- u. Jugendmedizin
- Homburg**, Universitätsklinikum des Saarlandes, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
- Itzehoe**, Klinikum Itzehoe, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Neonatologie und Intensivmedizin
- Jena**, Universitätsklinikum Jena, Neonatologie/Intensivmedizin
- Kassel**, Kinderklinik Kassel
- Kiel**, Klinik für Allgemeine Pädiatrie, UKSH Campus Kiel
- Köln**, Klinik und Poliklinik für Allgemeine Kinderheilkunde
- Köln**, Kliniken der Stadt Köln, Kinderkrankenhaus - Neonatologie
- Leipzig**, Universitätsklinik für Kinder und Jugendliche
- Leverkusen**, Klinik für Kinder und Jugendliche, Klinikum Leverkusen
- Lübeck**, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Lübeck, UKSH, Campus Lübeck
- Magdeburg**, Universitätskinderklinik, Perinatalzentrum Magdeburg
- Mannheim**, Klinikum Mannheim, Kinderklinik
- Mönchengladbach**, Städtische Kliniken GmbH
- Münster**, Universitätsklinikum Münster, Kinderklinik der Westfälischen Wilhelms-Universität
- Münster**, St. Franziskus-Hospital, Neonatologie und Kinderintensivmedizin
- Neuburg/ Donau**, Kliniken St. Elisabeth, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
- Nürnberg**, Klinikum Nürnberg Süd, IMC Neonatologie
- Regensburg**, Kinderklinik St. Hedwig
- Rostock**, Klinikum Südstadt, Abteilung für Neonatologie
- Saarbrücken**, Klinik für Kinder und Jugendmedizin
- Schwerin**, HELIOS Kliniken Schwerin GmbH, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
- Siegen**, DRK-Kinderklinik Siegen, Neonatologie
- Stuttgart**, Klinik für Kinder- u. Jugendmedizin, Olgahospital
- Trier**, Klinikum Mutterhaus der Borromäerinnen, Kinder- und Jugendmedizin
- Tübingen**, Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Abtlg. Neonatologie
- Wuppertal**, Helios Klinikum Wuppertal, Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin

## 7.2 Einverständniserklärung der Eltern

Lübeck  
Klinik 1

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)

## 7.3 Supplement Tabelle

Tabelle S 1 kurzfristige Komplikationen, andere maternale Herkunft

	Genotypen		Gesamt	p
	CC	CT/TT		
<b>NEC</b>	2,7% (52/1933)	2,9% (34/1188)	2,8% (86/3121)	0,776
<b>FIP</b>	2,2% (43/1933)	1,8% (21/1187)	2,1% (64/3120)	0,384
<b>PDA</b>	4,7% (91/1933)	3,4% (40/1189)	4,2% (131/3122)	0,069
<b>ROP</b>	2,9% (55/1928)	2,9% (34/1190)	2,9% (89/3118)	0,994
<b>Hirnblutung</b>	15,6% (302/1933)	18,1% (215/1189)	16,6% (517/3122)	0,073
<b>PVL</b>	2,6% (51/1930)	3,5% (41/1183)	3,0% (92/3113)	0,188
<b>Sepsis mit Erregernachweis (early- oder late-onset)</b>	12,8% (246/1921)	14,2% (168/1186)	13,3% (414/3107)	0,279
<b>BPD (Sauerstoff mit SSW 36+0)</b>	12,3% (232/1882)	13,1% (150/1149)	12,6% (382/3031)	0,558
<b>Tod (stationär)</b>	3,2% (61/1935)	4,5% (54/1191)	3,7% (115/3126)	0,046

## 8 Danksagung

Vielen Dank an Prof. Dr. med. Egbert Herting, Direktor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Lübeck, für die Möglichkeit, in seiner Kinderklinik promovieren zu dürfen.

Bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Wolfgang Göpel für die Übermittlung meines interessanten Themas, die Bereitstellung der Arbeitsmaterialien und für die effiziente und stets freundliche Unterstützung. Seine ansteckende Begeisterung für die Arbeit und Forschung in der Neonatologie hat mich tief beeindruckt und war mir zu jedem Zeitpunkt die größte Motivation.

Es war mir eine große Freude und Ehre, ein Teil des Teams der „German Neonatal Network“ Studie zu sein. Die freundliche Atmosphäre und das gemeinsame Miteinander haben die Monate zu einer besonderen Zeit gemacht.

Liebes Follow-Up Team mit Friederike Pagel, Birgit Schröder und Petra Sperner!  
Danke für die interessanten Monate mit euch auf den Straßen und in den Kinderkliniken Deutschlands! Die Monate der klinischen Follow-Up Untersuchungen waren eine lehrreiche und sehr schöne Zeit.

Eine hervorragende Einführung in die experimentelle Laborarbeit meiner Promotion habe ich Christine Marschke und Stefanie Sawall zu verdanken: ohne euch wären viele Pipetten leer geblieben.

Vielen lieben Dank an Bea Hatje und Irene Fischer! Eure Bürotür stand stets offen, ihr wart immer Ansprechpartner und hattet jederzeit ein offenes Ohr für meine Fragen.

Mein tiefster Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern. Ohne euch wäre mein Studium und diese Promotion nicht möglich gewesen. Danke für eure Motivation, die Geduld und das aufrichtige Interesse. Danke für eure Unterstützung!

Zu guter Letzt möchte ich meinen Dank aussprechen an die Eltern der eingeschlossenen Kinder und insbesondere den Kindern selbst für ihre Teilnahme, ohne die eine solche wichtige Studie nicht möglich wäre.

## 9 Lebenslauf



Lena Beyssell

\*12.04.1990 in Hamburg

### Promotion

2015-aktuell

„Laktase-Persistenz und Frühgeburlichkeit“

Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Lübeck, im Rahmen der Studie „German Neonatal Network“

01-06/2015

Follow-Up Untersuchungen der Studienteilnehmer an Kinderkliniken deutschlandweit als Mitglied eines 4-köpfigen Teams

05-07/2016

Experimentelle Tätigkeit im Labor

### Studium

10/2010-12/2017

Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck

03/2013

1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

04/2015-03/2017

Wissenschaftliche Hilfskraft in der GNN-Studienzentrale, Universität zu Lübeck

04/2016

2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

12/2017

3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

01/2018

Approbation als Ärztin

### Praktisches Jahr

11/2016-01/2017

Chirurgie, BG Klinikum Hamburg, Hamburg

01/2017-03/2017

Chirurgie, Kantonsspital St. Gallen, Schweiz

03/2017-07/2017

Innere Medizin, Sana Klinikum, Lübeck

07/2017-10/2017

Pädiatrie, Kinderkrankenhaus Wilhelmstift, Hamburg

### Berufserfahrung

seit 04/2018

Assistenzärztin der Pädiatrie,

Katholisches Kinderkrankenhaus Wilhelmstift in Hamburg