

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

**Genetisch veränderter Eisenstoffwechsel und sein Einfluss auf
das Risiko der nekrotisierenden Enterokolitis bei
Frühgeborenen unter 1500 g**

-

Eine Mendelsche Randomisierungs-Studie

Inauguraldissertation

zur

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

vorgelegt von
Josephine Drese, geb. Ridder
aus Münster

Lübeck 2020

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Göpel
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Lutz Wunsch

Tag der mündlichen Prüfung: 17.02.2021

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 17.02.2021

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Meinem Kinderarzt Dr. med. Johannes Warda gewidmet,
der mein Interesse an der Medizin geweckt hat.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	8
1.1 Morbidität und Mortalität Frühgeborener.....	8
1.2 Eisenmangel und Eisentherapie bei Frühgeborenen.....	9
1.3 Eisenhomöostase	13
1.4 Eisenhomöostase und Genetik - die hereditäre Hämochromatose.....	20
1.5 Eisen und Bakterien.....	23
1.6 Nekrotisierende Enterokolitis	24
1.7 Fragestellung.....	25
 2. Material und Methoden.....	 26
2.1 Deutsches Frühgeborenen-Netzwerk (German Neonatal Network, GNN)..<	26
2.1.1 Einschlusskriterien	26
2.1.2 Zeitliche und klinische Endpunkte	27
2.1.3 Messinstrumente und Softwareprogramme im 5-Jahres Follow up....	28
2.1.4 Datenbanken, Datenschutz und Monitoring.....	29
2.2 Studienpopulation und Definition der untersuchten Variablen	30
2.3 DNS-Isolierung	31
2.4 SNP-Auswahl.....	33
2.5 Genotypisierungsanalyse.....	34
2.6 Statistik	36
2.6.1 Mendelsche Randomisierung	36
2.6.2 Weitere statistische Analysen.....	38
2.7 Ethikvoten	38
 3. Ergebnisse.....	 39
3.1 Klinische Daten der Gesamtkohorte	40
3.2 Ergebnisse der Mendelschen Randomisierung	41
3.3 Klinische Daten aufgeschlüsselt für die TMPRSS6/rs855791 Genotypen ..	42
3.4 Therapiedaten aufgeschlüsselt für die TMPRSS6/rs855791 Genotypen....	43
3.5 Daten zum kurzfristigen Outcome aufgeschlüsselt für die TMPRSS6/rs855791 Genotypen	44
3.6 Effektstärke der kombinierten Genotypen.....	46

3.7	Effekt von TMPRSS6/rs855791 auf die Rate der NEC-Operationen für die Subgruppen Probiotikatherapie vs. keine Probiotikatherapie	47
3.8	Daten des 5-Jahres Follow up aufgeschlüsselt für die TMPRSS6/rs855791 Genotypen	48
4.	Diskussion	50
4.1	Diskussion der Ergebnisse	50
4.1.1	Genetik und nekrotisierende Enterokolitis	50
4.1.2	Eisen und Infektionen	51
4.1.3	Eisenassoziierte Veränderungen des Mikrobioms und die nekrotisierende Enterokolitis	52
4.1.4	Langfristige Auswirkungen einer Eisentherapie bei VLBW Frühgeborenen	54
4.2	Diskussion der Methoden	56
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick	59
5.	Zusammenfassung	60
6.	Literaturverzeichnis	62
7.	Anhänge	70
7.1	Anhang 1: CaseReportForms	70
7.2	Anhang 2: Protokoll zur DNS-Isolierung aus Mundschleimhautabstrichen mit dem QIAamp® 96 DNA Kit	73
7.3	Anhang 3: Protokoll zur DNS-Isolierung aus Nabelschnüren mit dem Gentra® Puregene® Tissue Kit	74
7.4	Anhang 4: Genotypisierungsanalyse mittels TaqMan®-PCR	75
7.5	Anhang 5: Allelische Diskriminierung mittels Cluster Plot	76
7.6	Anhang 6: Tabelle 9: Klinische Daten aufgeschlüsselt für die HFE/rs1799945 Genotypen	77
7.7	Anhang 7: Tabelle 10: Klinische Daten aufgeschlüsselt für die HFE/rs1800562 Genotypen	78
7.8	Anhang 8: Tabelle 12: Klinische Daten aufgeschlüsselt für die kombinierten Genotypen	79
8.	Danksagungen	80

9. Lebenslauf.....	82
---------------------------	-----------

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Eisenstoffwechsel	16
Abbildung 2: Flussdiagramm mit den Zahlen der eingeschlossenen Kinder in die GNN-Studie, den Absolutwerten der erfolgreichen Genotypisierungen für alle 3 SNPs sowie die Anzahl der nach- untersuchten Kinder im Rahmen des 5-Jahres Follow up	39
Abbildung 3: Ansatz der Mendelschen Randomisierung	41
Abbildung 4: Genotypisierungsanalyse mittels TaqMan®-PCR	75
Abbildung 5: Allelische Diskriminierung mittels Cluster-Plot	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht über die Typen der hereditären Hämochromatose	22
Tabelle 2:	Messinstrumente und Softwareprogramme im 5-Jahres Follow up..	28
Tabelle 3:	Untersuchte Variablen und ihre Definition	30
Tabelle 4:	Details zu den Polymorphismen sowie die jeweilige SNP-Eisen-Assoziation.....	34
Tabelle 5:	Klinische Daten der Gesamtkohorte.....	40
Tabelle 6:	Klinische Daten aufgeschlüsselt für die TMPRSS6/rs855791 Genotypen.....	43
Tabelle 7:	Therapiedaten aufgeschlüsselt für die TMPRSS6/rs855791 Genotypen.....	43
Tabelle 8:	Daten zum kurzfristigen Outcome aufgeschlüsselt für die TMPRSS6/rs855791 Genotypen.....	44
Tabelle 9:	Klinische Daten aufgeschlüsselt für die HFE/rs1799945 Genotypen.....	77
Tabelle 10:	Klinische Daten aufgeschlüsselt für die HFE/rs1800562 Genotypen.....	78
Tabelle 11:	Daten zur Rate der NEC-Operationen aufgeschlüsselt für die kombinierten Genotypen	47
Tabelle 12:	Klinische Daten aufgeschlüsselt für die kombinierten Genotypen....	79
Tabelle 13:	Effekt der TMPRSS6/rs855791 Genotypen auf die Rate der NEC-Operationen für die Subgruppen Probiotikatherapie vs. keine Probiotikatherapie	48
Tabelle 14:	Daten des 5-Jahres Follow up aufgeschlüsselt für die TMPRSS6/rs855791 Genotypen.....	49

Abkürzungen

AF	Allelfrequenz
BMP	Bone morphogenetic protein
BMP6	Bone morphogenetic protein 6
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
CRFs	CaseReportForms
d	Day (Tag)
DMT-1	Divalent metal transporter 1
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ECs	Endothelzellen
ELBW	Extremely low birth weight
EOS	Early-onset-Sepsis
ERFE	Erythroferrone
FAO	Food an Agriculture Organization of the United Nations
Fe	Eisen
Fe ²⁺	Eisen(II)-oxid
Fe ³⁺	Eisen(III)-oxid
FEV1	Forced expiratory volume in 1 second
FIP	Fokale intestinale Perforation
Fpn	Ferroportin
FRET	Fluoreszenzresonanzenergietransfers
g	Gramm
GDF-15	Growth differentiation factor 15
GNN	German Neonatal Network
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HFE	High Iron Fe
HH	Hereditäre Hämochromatose
HIF-2 α	Hypoxia-inducible factor 2 α
HJV	Hämojuvelin
HRE	HIF-responsive element
IL-6	Interleukin-6
IQ	Intelligenzquotient
IRE	Iron responsive element
IRP	Iron regulatory protein
IVH	Intraventrikuläre Hämorrhagie
JAK	Januskinase
kcal	Kilokalorie
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KiGGS	Kinder- und Jugendgesundheitssurvey

LOS	Late-onset-Sepsis
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MR	Mendelsche Randomisierung
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NTC	No template control
NEC	Nekrotisierende Enterokolitis
NFQ	Nicht-fluoreszierender Quencher
NTBI	Non-transferrin-bound iron
O ₂	Sauerstoff
OMIM	Online Mendelian Inheritance In Man
OP	Operation
OR	Odds Ratio
PCR	Polymerase chain reaction
Redox	Reduktions-Oxidations-Reaktion
ROP	Retinopathia Prematurorum
SD	Standardabweichung
SGA	Small for gestational age
SNP	Single nucleotide polymorphism
SSW	Schwangerschaftswoche
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TfR1	Transferrinrezeptor 1
TfR2	Transferrinrezeptor 2
TMPRSS6	Transmembranöse Serinprotease 6
TWSG1	Twisted gastrulation protein homolog 1
VLBW	Very low birth weight
WHO	World Health Organization
WPPSI-III	Wechsler Preschool And Primary Scale Of Intelligence
µl	Mikroliter

1. Einleitung

1.1 Morbidität und Mortalität Frühgeborener

Die Anzahl überlebender sehr leichter (Very Low Birth Weight (VLBW), < 1500 g) und extrem leichter (Extremely Low Birth Weight (ELBW), < 1000 g) Frühgeborener (Geburt $\leq 36 + 6$ Schwangerschaftswochen (SSW)) ist in den vergangenen Jahren aufgrund von stetigen Fortschritten in ihrer medizinischen Versorgung immer weiter gestiegen (Stoll et al., 2015; Jacob et al., 2017). Nichtsdestotrotz steht die Frühgeburtlichkeit in entwickelten Ländern als Ursache für Säuglingssterblichkeit weiterhin an erster Stelle (Helenius et al., 2017). Frühgeborene Kinder sind einem hohen Risiko ausgesetzt, sowohl akute als auch chronische Erkrankungen zu entwickeln. So ist circa 2/3 der perinatalen Morbidität auf Frühgeburtlichkeit zurückzuführen, was unter anderem durch die zum Teil extreme Unreife der Organe zu erklären ist (Herting, 2010). Morbidität und Mortalität sind dabei primär vom Gestationsalter und Geburtsgewicht abhängig (Bührer, 2016). Nahezu alle Organsysteme können von akuten als auch chronischen Problemen betroffen sein. Klassische neonatologische Erkrankungen betreffen das respiratorische System (Atemnotsyndrom, Lungenblutung, bronchopulmonale Dysplasie), das Herz-Kreislauf-System (persistierender Ductus arteriosus botalli, Hypotonie, persistierende pulmonale Hypertonie), den Gastrointestinaltrakt (fokale intestinale Perforation, nekrotisierende Enterokolitis, Kurzdarmsyndrom), das zentrale Nervensystem (intra- und periventrikuläre Blutungen, periventrikuläre Leukomalazie, Cerebralparese) sowie die Sinnesorgane Ohr (Taubheit) und Auge (Frühgeborenenretinopathie, Strabismus). Des Weiteren sind Frühgeborene aufgrund einer schwächeren Immunität häufiger von septischen Krankheitsbildern (Early-Onset-Sepsis (EOS), Late-Onset-Sepsis (LOS)) mit zum Teil seltenen Erregern (z. B. Pilze) betroffen (Herting, 2010; Bührer, 2016). Immer mehr Langzeitstudien demonstrieren, dass VLBW Frühgeborene aufgrund physischer, psychischer sowie kognitiver Einschränkungen auch bis in das Erwachsenenalter hinein Schwierigkeiten haben, die jeweiligen Entwicklungsaufgaben (z. B. finanzielle Unabhängigkeit, Aufbau fester Beziehungen außerhalb von Familie) zu bewältigen (Wolke und Jaekel,

2016). Ein reduzierter Gesamtintelligenzquotient um durchschnittlich bis zu einer Standardabweichung, sowohl im Kindes- als auch jungen Erwachsenenalter, sowie das höhere Risiko eine Angststörung, autistisches Verhalten oder auch Aufmerksamkeits- und/oder Zwangsstörungen zu entwickeln, sind einige der in der Literatur beschriebenen Probleme (Wolke und Jaekel, 2016; Bühner, 2016). VLBW Frühgeborene der GNN-Kohorte verstarben im Jahr 2010 am häufigsten an inflammatorischen (Sepsis und nekrotisierende Enterokolitis) sowie respiratorischen Erkrankungen (Stichtenoth et al., 2012). Diese Beobachtungen werden von der Aussage Bühners unterstützt, der die nekrotisierende Enterokolitis, das Atemnotsyndrom und die bronchopulmonale Dysplasie als häufigste mortalitätsassoziierte Faktoren bei einer Geburt vor der 28. Schwangerschaftswoche benennt (Bühner, 2016).

1.2 Eisenmangel und Eisentherapie bei Frühgeborenen

Ein zentraler Punkt in der Behandlung Frühgeborener ist die Sicherstellung einer ausreichenden enteralen Ernährung, die durch die Zusammensetzung der Makro- und Mikronährstoffe ein postnatales Gedeihen erzielt, das der fetalen Gewichtsentwicklung entspricht sowie die weitere funktionelle Entwicklung des Kindes optimal ermöglicht (Agostoni et al., 2010). In Zeiten eines gesteigerten Wachstums und vermehrter Zelldifferenzierung ist der Bedarf an dem Spurenelement Eisen besonders erhöht, da es essentiell für viele biochemische Prozesse ist (Lönnerdal et al., 2015). Frühgeborene haben aufgrund verschiedener Faktoren ein erhöhtes Risiko einen Eisenmangel zu entwickeln. Zudem manifestiert sich der Mangel in der Regel zu einem früheren Zeitpunkt als bei reifgeborenen Kindern. Dabei gilt, je kleiner die Gestationswoche und je leichter das Kind bei Geburt, desto höher ist die Gefahr eines Eisenmangels (Rao und Georgieff, 2009). Dies lässt sich damit erklären, dass die fetalen Eisenspeicher mit jeder vollendeten Gestationswoche steigen (Collard, 2009). Der größte Anteil wird dabei während des dritten Trimenons gespeichert (Beard et al., 2007). Dementsprechend sind, als Ausdruck reduzierter Körpereisenspeicher bei Frühgeborenen im Vergleich zu reifgeborenen Kindern, niedrigere Ferritinkonzentrationen im Nabelschnurblut zu messen (Hågå, 1980). Postnatal sind

VLBW Frühgeborene eher von einer zügigen Reduktion der Eisenspeicher betroffen, da neben der physiologischen Umstellung von fetalem Hämoglobin auf die adulte Form, eine deutlich gesteigerte Erythropoese vorliegt aufgrund rezidivierender Blutentnahmen im Rahmen der laborchemischen Diagnostik, einer reduzierten Lebensdauer der Erythrozyten sowie der rapiden Expansion des Blutvolumens und des Gesamthämoglobins bedingt durch das Aufholwachstum (Rao und Georgieff, 2009; Collard, 2009; Taylor und Kennedy, 2013). Aufgebrauchte Eisenspeicher demaskieren sich bei Reifgeborenen mit unzureichender Eisenaufnahme normalerweise erst in einem Alter von sechs bis neun Lebensmonaten in Form einer Eisenmangelanämie (Taylor und Kennedy, 2013). In einer Studie von Franz et al. konnte die Diagnose eines Eisenmangels bei VLBW Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1301 g oft bereits innerhalb der ersten zwei Lebensmonate gestellt werden (Franz et al., 2000).

Eine negative Eisenhomöostase prädisponiert die Frühgeborenen sowohl für kurz- als auch langfristige Beeinträchtigungen ihrer Entwicklung, die auch nach Ausgleich eines Eisenmangels persistieren können (Rao und Georgieff, 2007). So ist das Risiko für die Entstehung einer Eisenmangelanämie bei Frühgeborenen unter 1500 g Geburtsgewicht erhöht (Taylor und Kennedy, 2013). Die verminderte Sauerstoffbindungskapazität, in Kombination mit den für Frühgeborene typischen Problemen des Herz-Kreislauf-Systems, erhöht die Gefahr einer Gewebhypoxie. Extrem sensibel reagiert das fetale/neonatale Gehirn auf ein insuffizientes Sauerstoffangebot, da der Bedarf aufgrund einer hohen Rate metabolischer Prozesse während des Wachstumsprozesses sehr hoch ist. Circa 60 % des gesamten O₂-Verbrauches im Körper entfallen auf das Gehirn (Lönnerdal et al., 2015). Es gibt klare Evidenzen für ein schlechteres neurologisches Outcome unter Eisenmangelanämie und isoliertem Eisenmangel (Collard, 2009). In der Literatur sind schlechtere Langzeitergebnisse für das auditive Sprachverständnis, Feinmotorik sowie Selbstregulation im Zusammenhang mit niedrigeren Ferritinspiegeln im Nabelschnurblut beschrieben (Lozoff und Georgieff, 2006). Zudem zeigten Frühgeborene mit Eisenmangelanämie unreife Reflexe in der korrigierten 37. Schwangerschaftswoche, im Sinne eines reduzierten neurobehavioralen Status (Armony-Sivan et al., 2004). Neben dem zentralen Nervensystem scheinen weitere Organsysteme von einem Eisenmangel direkt

betroffen zu sein, noch bevor sich eine Eisenmangelanämie entwickelt. So werden veränderte Spiegel der Schilddrüsenhormone, gestörte Zellteilung, Immundefizienz und eine insuffiziente Regulation der Körpertemperatur bei VLBW Frühgeborenen mit einem Eisenmangel in Verbindung gebracht (Aggett, 2000; Dewey et al., 2002; Rao und Georgieff, 2009). Patel et al. werten eine schwere Anämie als einen beachtenswerten Risikofaktor für die Entstehung einer nekrotisierenden Enterokolitis bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g (Patel et al., 2016). Eine zeitige und zuverlässige Diagnose des Eisenmangels ist aufgrund der relativ leichten Korrektur dieses Zustandes von besonderer Relevanz, um mögliche negative Einflüsse auf die Entwicklung zu vermeiden (Beard et al., 2007). Die Entwicklung definierter Grenzwerte für Biomarker, die den Eisenmangel und die Anämie sensitiv bei Frühgeborenen beschreiben, ist jedoch schwierig. Bei der Festlegung und Interpretation der Blutwerte müssen viele physiologische Veränderungen bedacht werden, die Einfluss nehmen können. Dazu zählen zum Beispiel die Gestationswoche bei Geburt, Wachstumsprozesse, der Gesundheitszustand des Kindes sowie medikamentöse Behandlungen (Rao und Georgieff, 2009). Der Nachweis fehlender Eisenspeicher im Knochenmark und in der Leber wäre der maßgebende Standard zur Diagnose eines Eisenmangels. Aufgrund der hohen Risiken sowie Kosten dieser Prozedur wird das Auftreten einer hypochromen mikrozytären Anämie in Verbindung mit niedrigen Werten für das Serumferritin sowie die Transferrinsättigung ebenfalls für die Diagnose eines Eisenmangels akzeptiert (Franz et al., 2000).

Ein spannender Therapieansatz zur Prophylaxe des Eisenmangels und der Eisenmangelanämie ist die zeitlich verzögerte Abnabelung des Kindes nach der Geburt. Andersson et al. konnten zeigen, dass ein verzögertes Klippen der Nabelschnur (≥ 3 Minuten) im Vergleich zu einem verfrühten Klippen (≤ 10 Sekunden) sowohl das Risiko einer neonatalen Anämie reduziert als auch den Eisenstatus im Alter von 4 Lebensmonaten verbessert und damit das Auftreten eines Eisenmangels reduziert (Andersson et al., 2011). Des Weiteren ist die Transfusion von Erythrozytenkonzentraten zur Behandlung einer Frühgeborenenanämie ein gängiges Prozedere. Während des stationären Aufenthaltes erhalten $> 50\%$ der VLBW Frühgeborenen mindestens eine Erythrozytentransfusion (Patel et al., 2016). Entsprechend aktuellster Studienergebnisse wird jedoch ein

zurückhaltender Einsatz von Erythrozytenkonzentraten bei Frühgeborenen empfohlen, da eine restriktive Transfusionsgrenze nicht mit einem schlechteren Outcome der Kinder assoziiert ist und so das transfusionsassoziierte Risiko reduziert werden kann (Franz et al., ETTNO-Studie, mündliche Korrespondenz). Letzteres ist insbesondere von Bedeutung, da Kinder unter 12 Monaten deutlich häufiger von einer transfusionsassoziierten Komplikation betroffen sind als Erwachsene (Stainsby et al., 2008). Frühgeborene profitieren zudem von der Ernährung mit Muttermilch. Die Bioverfügbarkeit von Eisen aus Muttermilch ist höher, als aus speziell für Frühgeborene entwickelter Formelnahrung. Dies basiert zum Teil auf dem hohen natürlichen Vorkommen von Laktoferrin in der Muttermilch (Lönnerdal et al., 2015). Laktoferrin ist ein Protein, welches eine hohe Bindungsaffinität zu Eisen aufweist und die enterale Aufnahme von Eisen in die Mukosa erleichtert sowie steigert. Durch die feste Bindung an Laktoferrin verliert der Körper zudem weniger Eisen an potenziell pathogene Mikroorganismen im Darm, deren Wachstum und Differenzierung ebenfalls eisenabhängig ist (Lönnerdal, 2016). International existieren diverse Therapieempfehlungen pädiatrischer Gesellschaften für die Eisentherapie bei Frühgeborenen, ein global akzeptiertes Behandlungsprotokoll gibt es jedoch nicht (Rao und Georgieff, 2009). Das Komitee für Ernährung der *European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition* hat 2010 im Rahmen einer Richtlinie zur enteralen Ernährung für stabil wachsende Frühgeborene mit einem Körpergewicht bis 1800 g Empfehlungen zur Eisensubstitution veröffentlicht. Für Säuglinge mit einem Gewicht unter 1000 g sowie mit besonderen Komorbiditäten (z. B. BPD, Herzfehler, Kurzdarm) wurden keine spezifischen Empfehlungen ausgesprochen. Agostoni et al. empfehlen einen Beginn der oralen Eisentherapie mit zwei bis sechs Lebenswochen. Zu einer Dosierung von 2-3 mg/kg/d beziehungsweise 1,8-2,7 mg/100 kcal/d wird geraten. Kofaktoren wie zum Beispiel rezidivierende Bluttransfusionen, eine medikamentöse Behandlung mit Erythropoetin oder größere Blutverluste sollten bei der Wahl der Dosierung mit einbezogen werden (Agostoni et al., 2010). Aufgrund des gesteigerten Bedarfs an Eisen wird für den Zeitraum einer Erythropoetintherapie eine Gabe von 6 mg/kgKG/d empfohlen (Haiden und Pollak, 2010). Die Fortsetzung der Eisensupplementation ist, je nach Ernährung des Kindes, bis zum 6.-12. Lebensmonat empfohlen (Agostoni et al., 2010). Bei VLBW Frühgeborenen

empfiehlt es sich die höhere Dosierung zu wählen, da unter einer Eisentherapie mit lediglich 2 mg/kg/d bis zum 6. Lebensmonat bei bis zu 75 % der Kinder zum Zeitpunkt 12.-15. Lebensmonat ein Eisenmangel diagnostiziert wurde. Franz empfiehlt aufgrund dessen eine Eisensupplementierung von mindestens 4 mg/kg/d für Kinder mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g (Franz, 2010). Die orale Eisentherapie wird der parenteralen Gabe vorgezogen, da stetige intravenöse Zugänge über lange Zeiträume ein höheres Nebenwirkungsprofil haben und unter parenteraler Gabe laborchemisch gesteigerte Biomarker für oxidativen Stress nachgewiesen werden konnten (Franz, 2010; Haiden und Pollack, 2010). Die sehr schwankende enterale Resorption (8-40 %) bei Frühgeborenen muss jedoch bei der Bewertung der Therapieeffekte mit bedacht werden (Aggett, 2000). In der Regel werden Eisen-II-sulfate aufgrund einer günstigeren enteralen Resorption substituiert (Rao und Georgieff, 2009; Franz, 2010). Ist eine Ernährung mit angereicherter Muttermilch nicht möglich, wird die Verwendung einer Formelnahrung mit einem Eisenanteil von mindestens 12 mg/L empfohlen (Franz, 2010).

1.3 Eisenhomöostase

Nahezu jeder lebende Organismus hat einen essentiellen Bedarf für das Spurenelement Eisen. In ungebundener Form sind die zwei Oxidationsstufen Fe^{2+} und Fe^{3+} von biologischer Relevanz (Geissler und Singh, 2011). Die hohe Redox-Aktivität von anorganischem Eisen ermöglicht grundlegende biochemische Prozesse des Zellstoffwechsels sowie des Gesamtorganismus (Sangkhae und Nemeth, 2017). Eisenhaltige prosthetische Gruppen und Proteine sind unter anderem erforderlich für Sauerstofftransport und -speicherung (Hämoglobin, Myoglobin, Transferrin, Ferritin), Energiemetabolismus (Cytochrom c, NADH-Dehydrogenase), Informationsvermittlung (Ribonucleotidreduktase) sowie mikrobielle Abwehr (Myeloperoxidase, NADPH-Oxidase) (Ganz und Nemeth, 2015). Die Gesamteisenkonzentration beträgt 35-55 mg Fe/kg Körpergewicht bei gesunden Männern und Frauen (Sangkhae und Nemeth, 2017). Bei reifen Neugeborenen sind es, bezogen auf das Körpergewicht ca. 75 mg/kg (Rao und Georgieff, 2007). Der größte Anteil befindet sich gebunden an Hämoglobin in den

ausgereiften Erythrozyten und erythrozytären Vorstufen (2-3 g). Beinahe der gesamte Rest ist in Form von Ferritin in den Hepatozyten und retikuloendothelialen Makrophagen (v. a. Milz, Knochenmark, Leber) gespeichert. Kleine Eisenmengen sind jedoch in jeder Zelle nachzuweisen. Diese dienen dem zelleigenen Stoffwechsel. Täglich gehen unkontrolliert ca. 1-2 mg Eisen, primär durch die Desquamation von Darmzellen, verloren. Der Verlust wird über die Aufnahme von Eisen aus der Nahrung wieder ausgeglichen. Gebunden an sein Transportprotein Transferrin, wird anorganisches Eisen (Fe^{3+}) nach enteraler Aufnahme über das Plasma im Körper verteilt und von den Zielzellen über den Transferrinrezeptor 1 aufgenommen (Ganz, 2013). Das plasmatische Eisenaufkommen beträgt lediglich 2-4 mg. Dieser extrazellulär befindliche Anteil wird jedoch stets innerhalb weniger Stunden ausgetauscht, da bei adäquater Erythropoese 2×10^{15} Eisenatome in der Sekunde für die Häm synthese gebraucht werden (Muckenthaler et al., 2017). Dies entspricht einer Eisenmenge von ca. 20-25 mg in 24 Stunden. Primär die Makrophagen des retikuloendothelialen Systems liefern dafür das Eisen, welches sie durch Phagozytose und Abbau gealterter oder beschädigter Erythrozyten recyceln und im Anschluss an das Plasma abgeben (Knutson et al., 2005). Wird die Bindungskapazität von Transferrin durch eine zu hohe Konzentration an elementarem Eisen überschritten, entstehen Eisenverbindungen mit niedermolekularen Substraten. Dieses Non-Transferrin-Bound Iron (NTBI) begünstigt, durch die hohe Redox-Aktivität des Eisens, die Bildung freier Sauerstoffradikale. Massive Zellschädigungen sowie multiple Endorganschäden wie Zirrhose, Kardiomyopathie sowie endokrine Dysfunktionen können die Folge sein (Hershko, 2010).

Das Fehlen eines physiologischen Weges der aktiven Exkretion von Eisen aus dem Körper macht eine umso strenger kontrollierte Aufnahme aus dem Darm beziehungsweise Freisetzung aus Speicherorten unabdingbar (Fleming und Ponka, 2012). Der menschliche Organismus hat daher diffizile Regulationsmechanismen entwickelt, um jenen balancierten Eisenstoffwechsel zu erreichen, der zum einen die essentiellen Funktionen ermöglicht, zum anderen jedoch Toxizität verhindert. Maßgebend beteiligen sich 5 Zelltypen am Eisenstoffwechsel. Pränatal erfolgt die Eisenaufnahme des Fetus über Syncytiotrophoblasten der Plazenta (Ganz, 2013). Postnatal wird diese Aufgabe von den duodenalen

Enterozyten übernommen. Makrophagen des retikuloendothelialen Systems (v. a. der roten Milzpulpa, Leber und Knochenmark) speichern und recyceln. Die Hepatozyten sind ebenfalls große Eisenspeicher, nehmen jedoch zusätzlich durch die Bildung von Hepcidin eine zentrale Rolle in der Regulation des Eisenhaushaltes ein. Die größten Eisenkonsumenten stellen erythrozytäre Vorstufen dar (Fleming und Ponka, 2012). Die Nahrung enthält Eisen vorrangig in Form von Häm, Ferritin und anorganischem Eisen(III)-oxid. Letzteres gebunden in Komplexen mit anderen Makromolekülen (Ganz, 2013). Das saure Milieu des Magens sowie ein enzymatischer Abbau ermöglichen die Freisetzung des anorganischen Eisens aus seinen Verbindungen. Nach Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} durch eine im Bürstensaum befindliche Ferrireduktase (z. B. duodenales Cytochrom b) kann das Eisen über den Divalent Metal Transpoter 1 (DMT-1), lokalisiert an der apikalen Membran der Enterozyten, aufgenommen werden (Shawki et al., 2012). Im Anschluss wird das Eisen je nach systemischem und zellulärem Eisenstatus in Ferritin gespeichert, für zelleigene biochemische Prozesse verwendet oder von der apikalen Membran, durch die Zelle zur basolateralen Membran transportiert und über Abgabe in das Plasma dem Organismus zur Verfügung gestellt (Wang und Babitt, 2019). In welcher Form das hoch Redox-aktive Fe^{2+} innerhalb der Zelle transportiert wird ist Gegenstand aktueller Forschungen. Ebenso sind die Mechanismen der transmembranen Aufnahme und Abgabe für Häm und Ferritin noch nicht in Gänze verstanden.

Ferritin, ein sphärisches heteropolymeres Protein, ist in 24 Untereinheiten strukturiert, welche entweder aus leichten (light, L) oder schweren Ketten (heavy, H) bestehen. Es ist in der Lage große Mengen an Eisen intrazellulär zu speichern. Eine Bindung und Speicherung von anorganischem Eisen ist erst nach Oxidation zu Fe^{3+} durch die Ferroxidase-Aktivität der H-Ketten möglich (Fleming und Ponka, 2012; Ganz, 2013). Der einzig bekannte Eisenexporter, der den Transfer von freiem Eisen von intrazellulär in das plasmatische Kompartiment ermöglicht, ist Ferroportin (Fpn) (McKie et al., 2000; Donovan et al., 2000; Abboud und Haile, 2000). In großer Dichte kann der Exporter bei duodenalen Enterozyten, Makrophagen, Hepatozyten, erythrozytären Vorstufen und Syncytiotrophoblasten der Plazenta nachgewiesen werden (Ganz, 2013). Gebunden wird das Eisenatom in der Höhlung des Transporters. Konformationsänderungen im Protein führen zu

zwei verschiedenen Zuständen. Eine nach innen gewandte Öffnung zur Aufnahme des elementaren Eisens aus dem Zytoplasma und gegensätzlich dazu eine nach außen gerichtete Öffnung zur Abgabe in das Plasma (Wang und Babitt, 2019). Der aktive Transport über Fpn und die Bindung an Transferrin ist jedoch nur in der Oxidationsstufe Fe^{3+} möglich. Katalysiert durch die kupferhaltigen Ferroxidasen Ceruloplasmin, Hephaestin (Cherukuri et al., 2005) und Zyklopen (Vashchenko und MacGillivray, 2013) wird das zuvor im Zytoplasma lokalisierte Fe^{2+} zu Fe^{3+} oxidiert.

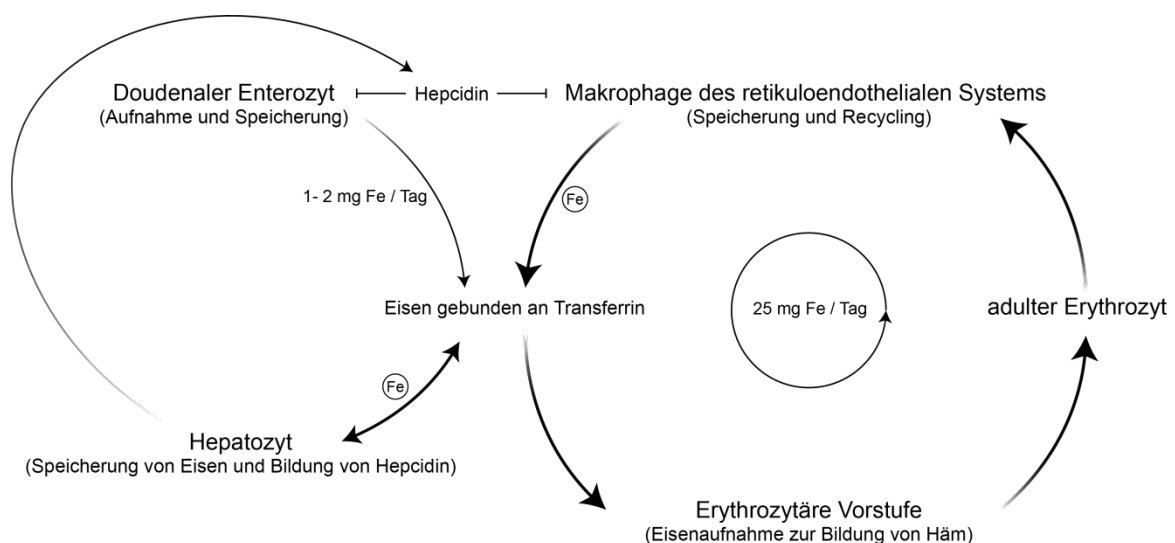


Abbildung 1: Eisenstoffwechsel (nach: Fleming und Ponka, 2012)

Da eine balancierte Gesamtkörpereisenkonzentration nur durch eine Kontrolle auf der Stufe der enteralen Absorption sowie der Freisetzung durch Makrophagen und Hepatozyten erreicht werden kann, stellt Fpn eine zentrale Stellschraube der Eisenregulation dar. Die Konzentration von Fpn auf eisenexportierenden Zellen verhält sich proportional zu der, in den Blutkreislauf eintretenden Eisenmenge (Sangkhue und Nemeth, 2017). Regulierungen erfolgen sowohl auf zellulärer Ebene als auch systemisch. In der Literatur beschriebene Signale, die auf zellulärer Ebene wirken, sind Hypoxie und Eisenmangel. Sich anschließende Prozesse beeinflussen unter anderem die Fpn-Synthese auf der Stufe der Transkription sowie posttranskriptional. Der Hypoxia-Inducible Factor 2alpha (HIF-2 α) wirkt als direkter Aktivator der Transkription von Fpn. Bestehen ausgeglichene Sauerstoff- und Eisenverhältnisse wird der Transkriptionsfaktor zügig durch die

Prolylhydroxylase an einem Prolinrest hydroxiliert und im Proteasom abgebaut. Dieser Mechanismus ist jedoch abhängig von Eisen und O_2 . Sobald diese Kofaktoren in Mangelsituationen fehlen, wird die Degradierung von HIF-2 α verlangsamt. HIF-2 α wandert in den Kern und bindet aktivierend an ein HIF-Responsives Element (HRE) in der Promotorregion von Fpn (Ward und Kaplan, 2012). Posttranskriptional reguliert das Iron Regulatory Protein/Iron-Responsive Element-System (IRP/IRE) und beeinflusst dabei mehrere Teilnehmer des Eisenstoffwechsels. Auslösendes Signal ist ein Eisenmangel. Das IRE bezeichnet ein cis-Element, lokalisiert in einem nicht-codierenden Bereich am 5' oder 3'-Ende der Ziel-messengerRNA (mRNA). Die Bindung von IRP1 oder IRP2 an einem IRE im Bereich des 5'-Ende wirkt hemmend auf die Translation der jeweiligen mRNA, während eine Bindung am 3'-Ende zu einer Aktivierung führt. Ein 5'-IRE findet sich unter anderem bei der mRNA der H- und L-Ketten von Ferritin sowie bei Ferroprotein. Folglich wird in Situationen eines Eisenmangels sowohl die Speicherung als auch der Export von anorganischem Eisen gehemmt. Hingegen wird die mRNA vom Transferrinrezeptor 1 und DMT-1, durch die Interaktion eines IRP mit dessen 3'-IRE stabilisiert (Hentze et al., 2010).

Der wohl wichtigste regulierende Prozess der Eisenhomöostase findet auf systemischer Ebene statt und wird durch ein in den Hepatozyten produziertes Protein vermittelt. Hepcidin, das zentrale „Hormon“ des Eisenstoffwechsels, gehört zu der Familie der Defensine. Seine Schlüsselfunktion ist die negative Regulierung im Eisenstoffwechsel. Die Primärstruktur weist 25 Aminosäuren auf, ausgeschieden wird das Protein über die Niere (Park et al., 2001). Über die Bindung seines NH_2 -Terminus an die Fpn-Bindungsstelle leitet Hepcidin die Internalisierung und den sich anschließenden Abbau von Fpn ein. Auf diesem Wege wird der Transfer von Eisen in das Plasma reduziert, das Spurenelement verbleibt in den Zellen (Nemeth et al., 2004). Durch die reduzierte Eisenabgabe aus Makrophagen und Hepatozyten, trotz des Fortbestehens der Erythropoese sowie Verlusten über die Fäzes in Folge der Abschilferung duodenaler Enterozyten, führt die Sekretion von Hepcidin zu schnell messbaren Veränderungen der Eisenkonzentration im Plasma. Neuere Daten zeigen, dass die Hemmung der Fpn-Aktivität durch Hepcidinbindung auch rein über eine Blockierung der Transportfunktion erfolgen kann, unabhängig eines Abbaus (Aschemeyer et al., 2018). Sowohl die

unkontrollierte Freisetzung als auch der Hepcidinmangel resultieren in drastischen Dysbalancen der Eisenkonzentration und können zu schweren Erkrankungen des betroffenen Organismus führen. In diesem Zusammenhang sind Unterformen der hereditären Hämochromatose zu nennen, die entweder durch einen Mangel oder durch eine Dysfunktion des Proteins zu einer systemischen Eisenüberladung führen. Eine überschießende Produktion von Hepcidin ist hingegen mit schweren Eisenmangelanämien assoziiert.

Die Expression von HAMP (Hepcidinen) wird auf der Ebene der Transkription durch stimulierende und hemmende Signalkaskaden kontrolliert. Inflammation, Veränderungen des Eisenstatus intrazellulär und im Plasma sowie eine gesteigerte Erythropoese sind Signale, die maßgeblich die Hepcidintranskription beeinflussen (Fleming und Ponka, 2012). Die HAMP-Expression wird stimuliert durch Inflammation und hohe intrazelluläre und plasmatische Eisenkonzentrationen. Ersteres vermittelt über die Interleukin-6/Januskinase-Signal Transducer and Activator of Transcription-Kaskade (IL-6/JAK-STAT) eine transkriptionale Änderung, letzteres agiert via dem Bone Morphogenetic Protein /SMAD-Signalweg (BMP/SMAD) (Sangkhae und Nemeth, 2017). Sowohl eine erhöhte plasmatische, als auch intrazelluläre Eisenkonzentration wird von der Leber erkannt. Die Endstrecke beider Signale ist nach aktuellem Stand die BMP/SMAD-Kaskade, aber die auslösenden Liganden, Rezeptortypen und weitere Kofaktoren unterscheiden sich zum Teil. Steigt das Eisenangebot über Transferrin sowie das Vorkommen von NTBI im Plasma, so erhöht sich folglich auch die zelluläre Eisenaufnahme. Hepatische Endothelzellen (ECs) nehmen bei der Wahrnehmung dieser Veränderung eine wichtige Rolle ein. Nach Registrierung einer erhöhten Eisenmenge steigt die Produktion des Bone Morphogenetic Protein 6 (BMP6) in den ECs. BMP6 ist ein Ligand, der gebunden an Hämajuvelin (HJV) die Kompetenz erlangt, die Bildung eines Komplexes aus dem in der hepatozytären Membran lokalisierten BMP-Rezeptor Typ 1 und Typ 2 sowie Neogenin zu ermöglichen (Wang und Babitt, 2019). Dieser Signalkomplex aktiviert über Phosphorylierung SMAD 1/5/8, welche wiederum einen heterotrimeren Komplex mit SMAD4 bilden und in den Nukleus translozieren, um dort die Transkription des Zielgens HAMP anzuregen (Dörpholz et al., 2016). Hepatozyten können auch auf direktem Wege eine erhöhte plasmatische Eisenkonzentration wahrnehmen und die Hepcidinexpression über die BMP-SMAD Achse stimulieren (Wang und Babitt,

2019). Die Bindung eines 2Fe-Transferrin an den Transferrinrezeptor 1 (TfR1) der Hepatozyten verdrängt das humane hämochromatose Protein HFE aus seiner Bindung an TfR1. Das Histokompatibilitätskomplex Klasse 1-like Protein wurde initial entdeckt im Rahmen der Forschungen zur klassischen Form der hereditären Hämochromatose (Sanghkae und Nemeth, 2017). HFE interagiert mit dem Transferrinrezeptor 2 (TfR2), der ebenfalls transmembranös lokalisiert ist. Beide Proteine stimulieren die Bildung von Hepcidin vermittelt über SMAD (Wang und Babitt, 2019). Sinkt hingegen der plasmatische und zelluläre Eisenstatus und es entwickelt sich ein Mangel, ist dies ein Signal für eine verstärkte Aktivität der hepatischen Matriptase-2 (Transmembranöse Serinprotease 6, TMPRSS6) und Furin. Beide wirken negativ regulierend auf die BMP-SMAD Signalkaskade, indem sie Hemojuvelin inaktivieren. Es kommt zu einer Unterdrückung der HAMP-Expression (Sanghkae und Nemeth, 2017). Folglich schließt sich an einen niedrigen Eisenstatus, wie beschrieben, eine hemmend wirkende Signalkaskade an, die den Organismus vor einer unkontrollierten Hepcidinproduktion schützt.

Inflammation führt nachweislich zu einer erniedrigten Eisenkonzentration im Plasma und kann bei chronischer Aktivität eine Eisenmangelanämie hervorrufen. Das reduzierte Angebot ist Teil der immunologischen Antwort des Wirtes auf eingedrungene pathogene Mikroorganismen, die ebenso auf Eisen als Nahrungsquelle angewiesen sind. Durch die Freisetzung von IL-6 und die sich anschließende Bindung an den IL-6-Rezeptor wird, mithilfe der Januskinase 2, der nachgelagerte Transkriptionsfaktor STAT3 phosphoryliert. STAT3 wandert in den Kern und bindet an seine Zielstruktur in der HAMP-Promotorregion. Das Ergebnis ist eine gesteigerte Hepcidinproduktion (Sanghkae und Nemeth, 2017). In Situationen mit gesteigerter Erythropoese (Hypoxie, Anämie, Blutung) besteht ein erhöhter Eisenbedarf und das Wirken von Hepcidin ist herabgesetzt. Gehemmt wird die Hepcidinsynthese unter anderem durch den Botenstoff Erythroferrone (ERFE) der, stimuliert durch Erythropoetin, aus Erythroblasten sezerniert wird (Wang und Babitt, 2019). Weitere Kandidatenmoleküle, die im Verdacht stehen im Rahmen von gesteigerter oder ineffektiver Erythropoese Hepcidinbildung zu unterdrücken, sind der Growth Differentiation Factor 15 (GDF-15) und das Twisted Gastrulation Protein homolog 1 (TWSG1) (Fleming und Ponka, 2012). Wie genau diese Faktoren wirken und über welche Signalkaskaden die Informationen

vermittelt werden, ist Gegenstand aktueller Studien. Ebenso wird der suppressorische Einfluss von Sexual- sowie Wachstumshormonen auf die HAMP-Expression erforscht (Goodnough et al., 2012; Guo et al., 2013).

1.4 Eisenhomöostase und Genetik - die hereditäre Hämochromatose

Durch umfangreiche genomweite Assoziationsstudien (GWAS) konnte eine Vielzahl von Genen identifiziert werden, die Einfluss auf den humanen Eisenstoffwechsel nehmen. Mutationen in entsprechenden Genen können sowohl zu einem Überschuss an Eisen als auch zu einem Eisenmangel führen. In beiden Fällen sind die negativen Auswirkungen auf den Gesundheitszustand eines Menschen gut beschrieben. Die hereditäre Hämochromatose (HH) ist eine primäre Eisenspeicherkrankheit. Im menschlichen Organismus sind fünf für die Eisenhomöostase relevante Gene identifiziert, die bei mutationsbedingtem Funktionsverlust mit der hereditären Hämochromatose assoziiert sind. Dazu zählen genetische Varianten im HFE-, Hemojuvelin-, HAMP-, Transferrinrezeptor 2- und Ferroportin-Gen (Brissot und Loréal, 2016). Geht die Aktivität eines oder mehrerer Gene verloren, bedingen die sich anschließenden Effekte Hepcidinmangel, Hepcidinresistenz oder Funktionsverlust seitens Ferroportin, eine Störung der Hepcidin-Ferroportin-Achse. Die Pathogenese der hereditären Hämochromatose umfasst demnach eine Dysregulation des Eisenstoffwechsels, welche hochpathologische Eisenkonzentrationen im Plasma und Gewebe hervorrufen kann (Wallace und Subramaniam, 2016).

Der HFE-assoziierte Subtyp ist die „klassische“ Form der hereditären Hämochromatose (Typ 1, OMIM 235200) und weist einen autosomal-rezessiven Erbgang auf. Bei Homozygotie resultiert ein defektes HFE-Protein und es entfällt die Fähigkeit, auf erhöhte Eisenplasmakonzentrationen mit einer gesteigerten Hepcidinproduktion zu reagieren, da die Aktivierung der BMP/SMAD-Signalkaskade nicht stattfindet (Bardou-Jacquet et al., 2014). Trotz eines fehlenden Bedarfs kommt es in der Folge zu einem massiven Transfer von Eisen aus den duodenalen Enterozyten sowie aus den Makrophagen des retikuloendothelialen Systems in das Plasma, da die erniedrigte Hepcidinkonzentration eine fehlende Downregulation des Eisenexporters Ferroportin zur

Folge hat. Wird eine Transferrinsättigung von 45 % überschritten entstehen NTBI, die über oxidativen Stress Zellschäden verursachen. Ein anhaltend pathologischer Eisenüberschuss kann so zu Organschäden führen. Vor allem betroffen sind die Leber (erhöhte Transaminasen, Hepatomegalie, Zirrhose, hepatozelluläres Karzinom), Pankreas (Diabetes), Herz (Myopathien, Herzrhythmusstörungen) und Haut (Hyperpigmentierung) (Brissot et al., 2018). Patienten mit einer HFE-assoziierten Hämochromatose entwickeln erste Symptome in der Regel zwischen der 4. und 5. Lebensdekade. Die Bandbreite der Befunde umfasst einfache biochemische Pathologien (veränderte Blutwerte) bis hin zu schweren lebenslimitierenden siderosebedingten Organschäden.

Die genetischen Varianten im HJV-Gen (Typ 2A, OMIM 602390), HAMP-Gen (Typ 2B, OMIM 613313) und Tfr2-Gen (Typ 3, OMIM 604250) weisen ebenfalls einen autosomal-rezessiven Erbgang auf. Ebenso wie bei der HFE-assoziierten Hämochromatose verursacht eine Mutation im HJV-Gen oder im HAMP-Gen bei homozygotem Auftreten eine Reduktion oder sogar Ausbleiben der Hepcidinproduktion. Zwar sind diese Formen der HH sehr selten, der Schweregrad im Vergleich zu der HFE-assoziierten Hämochromatose jedoch deutlich schwerer. Patienten manifestieren in der Regel bereits mit 20-30 Jahren und weisen gravierendere Organbeteiligungen mit höheren Komplikationsraten auf (Bardou-Jacquet et al., 2014). Diese Formen werden unter dem Begriff der juvenilen Hämochromatose zusammengefasst.

Ebenso kann die hereditäre Hämochromatose durch eine Mutation im Tfr2-Gen bedingt sein. Bei Manifestation präsentiert sich der Phänotyp in der Regel intermediär zwischen dem der HFE-Hämochromatose und den Formen der juvenilen Hämochromatose (Brissot et al., 2018).

Unter die Definition der hereditären Hämochromatose Typ 4 fallen zwei verschiedene Phänotypen. Beide Mutationen des Ferroportin-Gens (SLC40A1, OMIM 606069) werden autosomal-dominant vererbt. Der Typ 4B führt durch eine veränderte Bindungsstelle zu einer Hepcidinresistenz seitens Ferroportin, während bei dem Typ 4A der transmembranöse Eisentransport über Ferroportin durch eine loss-of-function-mutation vollständig fehlt. Zuletzt genannter Typus wird auch als Ferroportin-Krankheit bezeichnet (Brissot und Loréal, 2016). Der Phänotyp, der genetischen Variante 4B ähnelt dem der hereditären Hämochromatose Typ 1 und 3. Da sich bei einer Mutation vom Typ 4A jedoch ein abweichender

Phänotyp entwickelt, wird die Zuordnung dieser Variante zum Kreis der hereditären Hämochromatose von einigen Fachleuten als kritisch bewertet (Brissot et al., 2018). Durch den fehlenden Transport über Ferroportin verbleibt das Eisen bei dem Typ 4A größtenteils intrazellulär und kann vor allem in hohen Konzentrationen in den Makrophagen des retikuloendothelialen Systems (Milz) und in etwas geringerer Konzentration in der Leber (Kupffer-Zellen) nachgewiesen werden. Biochemisch finden sich zwar deutlich erhöhte Ferritinwerte, am ehesten aufgrund der Makrophagen als primäre Quelle, jedoch liegt die Transferrinsättigung eher im Normbereich oder ist teilweise sogar erniedrigt. Der Phänotyp der Ferroportin-Erkrankung fällt aufgrund der vorherrschend in den Makrophagen lokalisierten pathologischen Eisenkonzentration eher milde aus (Brissot und Loréal, 2016).

Tabelle 1: Übersicht über die Typen der hereditären Hämochromatose

	HFE assoziierte HH	Juvenile HH		TfR2 assoziierte HH	Ferroportin assoziierte HH
OMIM- Klassifikation	Typ 1	Typ 2, Subtyp A	Typ 2, Subtyp B	Typ 3	Typ 4
Betroffenes Gen, chrom. Lokus	HFE, 6p21.3	HJV, 1q21	HAMP, 19q13.1	TfR, 7q22	SLC40A1, 2q32
Name des Gens	HFE	Hemojuvelin	Hepcidin	Transferrin receptor 2	Ferroportin
Erbgang	Autosomal- rezessiv	Autosomal-rezessiv		Autosomal- rezessiv	Autosomal- dominant
Risiko eines Organschadens	variabel	hoch	hoch	variabel	niedrig
Alter bei Manifestation	40-50 Lj.	20-30Lj.		40-50 Lj.	40-50 Lj.

HH, hereditäre Hämochromatose

Quellen: nach Pietrangelo, 2004; OMIM Datenbank (Online Mendelian Inheritance in Man)

In der überwiegenden Zahl der manifesten Hämochromatose-Fälle lässt sich der C282Y-Polymorphismus (rs1800562) im HFE-Gen nachweisen. Die Prävalenz variiert stark innerhalb ethnischer Populationen. Bei Patienten mit nordeuropäischer Abstammung findet sich bei ungefähr 80 % die homozygote Variante C282Y (Pietrangelo, 2010). Insgesamt betrachtet wird die homozygote

Allelfrequenz für C282Y bei Individuen kaukasischer Abstammung in der Literatur relativ stabil mit ca. 0,4 % angegeben (Brissot et al., 2018; Barton und Edwards, 2018). Im Gegensatz dazu erreichte die Subpopulation Asien nur eine geschätzte Prävalenz von 0,000039 % in der HEIRS-Studie (Adams et al., 2005). Der H63D-Polymorphismus (rs1799852) ist ebenfalls als eine mögliche Variante für das HFE-Gen beschrieben. Zwar weist die Mutation eine höhere Prävalenz mit einer kombinierten Allelfrequenz von ungefähr 14 % in der allgemeinen europäischen Bevölkerung auf, jedoch scheint die Penetranz deutlich schwächer (Gochee et al., 2002; Barton et al., 2015).

Der C282Y-Polymorphismus ist 10mal häufiger als die gängige Mutation für cystische Fibrose. Dass trotzdem nur eine kleine Gruppe von Individuen mit C282Y Homozygotie tatsächlich klinisch manifest erkrankt, liegt an der geringen Penetranz der Mutation (Pietrangelo, 2010). Es bedarf weiterer Faktoren, die die Expression eines auffälligen Phänotyps provozieren (Wallace und Subramaniam, 2016). Einflussnehmende Faktoren aus dem Bereich Genetik und Umwelt sind in der Literatur umfangreich beschrieben (Fleming und Ponka, 2012).

1.5 Eisen und Bakterien

Ebenso wie Vertebraten benötigen fast alle fakultativ oder obligat pathogenen Mikroorganismen Eisen, welches als essentielle Komponente diverser basaler Stoffwechselprozesse Differenzierung und Wachstum ermöglicht (Ganz und Nemeth, 2015). Neben der Menge an exogen verfügbarem Eisen, hat das Geschick der Mikroorganismen, Eisen aus ihrer Umgebung aufzunehmen, direkt Einfluss auf die Virulenz der Erreger (Drakesmith und Prentice, 2012). Sowohl Wirt als auch Pathogen haben folglich unter dem Selektionsdruck in der Evolution individuelle Strategien entwickelt, den Eisenstoffwechsel dem eigenen Vorteil entsprechend regulieren zu können, um das Überleben zu sichern (Armitage und Drakesmith, 2014). Ziel humaner Abwehrmechanismen ist es, die Verfügbarkeit von Eisen systemisch als auch intrazellulär zu senken, um den Mikroorganismen die exogene Nahrungsquelle zu entziehen und damit die Pathogenität zu senken (Ganz und Nemeth, 2015). Hingegen haben humanpathogene Organismen den Vorgang der Aufnahme sowie die, am Eisenstoffwechsel beteiligten Proteine

immer weiter spezifiziert (Armitage und Drakesmith, 2014). Entwickelt sich bei einem Menschen iatrogen oder genetisch bedingt ein Überangebot an Eisen, so kann der begleitende Anstieg der NTBI-Konzentration das Wachstum fakultativ oder obligat pathogener Organismen begünstigen und damit die Morbidität und Mortalität des Wirts extrem negativ beeinflussen (Drakesmith und Prentice, 2012). Es zeigt sich, dass Patienten die an einer hereditären Hämochromatose leiden, prädisponiert sind, für seltene Infektion mit siderophilen gram-negativen Bakterien (z. B. *Vibrio species*, *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pestis*) (Ganz und Nemeth, 2015). Malaria, Tuberkulose aber auch HIV-1 sind weitere Erkrankungen, deren Pathogenität unter anderem vom Eisenstatus des Wirts abhängt. (Drakesmith und Prentice, 2012). Multiple Transfusionen von Erythrozytenkonzentraten, aber auch eine orale Supplementation können iatrogene Gründe für unphysiologische Eisenkonzentrationen im Plasma, Darm sowie in weiteren Organen sein (Drakesmith und Prentice, 2012; Ganz und Nemeth, 2015). Clusterrandomisierte Studien an Kindern aus Ländern in Entwicklung konnten unter täglicher oraler Eisensubstitution ein verstärktes Auftreten von teils blutigen Diarrhoen sowie eine höhere Rate der Hospitalisierung aufzeigen (Soofi et al., 2013; Zlotkin et al., 2013). Ursache für die erhöhte enterale Morbidität scheint eine Dysbalance im Mikrobiom des Darms zu sein, die sich aufgrund des begünstigten Wachstums pathogener siderophiler Bakterien unter oraler Eisentherapie entwickelt (Jaeggi et al., 2015). Lactobacillen und Bifidusbakterien repräsentieren hingegen zwei Bakterienspezies, die die Integrität des Darms schützen (Paganini et al., 2017). Unter oraler Eisensupplementation scheint sich das Verhältnis schützender Bakterien zu Gunsten eines pathogeneren Profils zu verschieben und damit intestinale Inflammation zu begünstigen (Jaeggi et al., 2015).

1.6 Nekrotisierende Enterokolitis

Die nekrotisierende Enterokolitis (NEC) ist eine schwerwiegende potentiell lebensbedrohliche Erkrankung, die primär in der Gruppe der VLBW Frühgeborenen auftritt (Segerer, 2010). Die Anzahl betroffener Frühgeborener mit einem Geburtsgewicht zwischen 500 g und 1500 g beträgt circa 7 %. Die Mortalität liegt bei geschätzten 20-30 %, wobei vor allem die Kinder betroffen sind, die einer

operativen Versorgung bedürfen (Neu und Walker, 2011). Eine plötzliche Nahrungsunverträglichkeit, blutige Diarrhoen sowie ein aufgetriebenes bläulich verfärbtes Abdomen können gastrointestinale Zeichen einer NEC sein. Vermehrte kardiorespiratorische Instabilität, Lethargie und Temperaturinstabilität sind Ausdruck der möglichen schweren systemischen Beteiligung (Schnabl et al., 2008). Neben einer genetischen Disposition, intestinaler Unreife, unzureichender Durchblutung sowie einer unkontrollierten Immunantwort ergibt sich durch kürzlich erfolgte Studien immer stärker der Hinweis darauf, dass ein Ungleichgewicht im enteralen Mikrobiom, im Sinne eines gesteigerten Vorkommens pathogener Darmkeime, als wesentlicher Risikofaktor für die Entstehung einer NEC nicht unterschätzt werden darf (Neu und Walker, 2011; Warner et al., 2016). Der schützende Einfluss von Muttermilch und Probiotika beziehungsweise die negative Auswirkung einer Antibiotikatherapie werden unter Berücksichtigung der NEC/Darmmikrobiom-Interaktion ebenfalls deutlicher (Warner et al., 2016).

1.7 Fragestellung

Mutationen im HFE- und Tmprss6-Gen sind assoziiert mit veränderten Eisenparametern (Galesloot et al., 2013). Ein erhöhtes Eisenangebot im Darm kann das Wachstum pathogener Mikroorganismen begünstigen und so das enterale Mikrobiom nachteilig beeinflussen sowie entzündliche Veränderungen provozieren (Deschemin et al., 2016). Die vorliegende Arbeit untersucht die Hypothese, dass VLBW Frühgeborene mit genetischen Varianten, die zu höheren Serumeisenspiegeln führen, seltener eine operationspflichtige nekrotisierende Enterokolitis entwickeln. Darüber hinaus wurde untersucht, ob bei Frühgeborenen mit genetischer Prädisposition zu hohen Serumeisenspiegeln weitere kurz- und langfristige Outcome Parameter verändert sind.

2. Material und Methoden

2.1 Deutsches Frühgeborenen-Netzwerk (German Neonatal Network, GNN)

Das am 1. Januar 2009 gegründete Deutsche Frühgeborenen-Netzwerk ist eine multizentrisch angelegte, prospektive Kohortenstudie und in ihrem Format die erste langfristige sowie kontrollierte Datenerhebung im Bereich der Neonatologie in Deutschland. Eine Vorläuferstudie des GNN fand in den Jahren zwischen 2003 und 2008 statt. Der Studiensitz befindet sich am Universitätsklinikum Lübeck. Im Interesse des Frühgeborenen-Netzwerks ist es die Auswirkungen sozialer und genetischer Einflussfaktoren, zentrumsspezifischer Behandlungsstrategien sowie die Effekte neuer Therapien auf die kurz- und langfristige Entwicklung von Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g zu untersuchen. Sowohl die systematische Erhebung klinischer Verlaufs- und Outcomedaten der eingeschlossenen Kinder als auch die Erstellung einer DNS-Datenbank mit standardisiert entnommenen Proben der Frühgeborenen und ihrer leiblichen Mütter bilden die Grundlage für die Erforschung potentieller Risikofaktoren. Ziel der Studie ist eine nachhaltige Verbesserung der Betreuung und Versorgung von Frühgeborenen unter 1500 g.

2.1.1 Einschlusskriterien

Bis zum 31.12.2016 wurden alle Neugeborenen mit $\leq 36 + 6$ Schwangerschaftswochen **und** einem Gewicht von < 1500 g bei Geburt eingeschlossen. Ab dem 01.01.2017 galt eine Schwangerschaftswoche von $\leq 28 + 6$ **oder** ein Geburtsgewicht unter 1000 g als Kriterium für den Studieneinschluss. Eine erneute Änderung der Einschlusskriterien fand zum 01.01.2020 statt. Aktuell werden nur noch Frühgeborene mit einem Gestationsalter von $\leq 26 + 6$ Schwangerschaftswochen eingeschlossen. Die Verlegung eines Kindes aus einer anderen Kinderklinik in eine teilnehmende Klinik gilt seit 2009 als Ausschlusskriterium. Erfüllt ein Kind die Kriterien für einen Einschluss wird den Eltern ein Aufklärungs- und

Einverständnisbogen überreicht. Zudem erfolgt ein Aufklärungsgespräch durch eine(n) ärztliche(n) Mitarbeiter/-in.

2.1.2 Zeitliche und klinische Endpunkte

Nach schriftlicher Einwilligung für die Studienteilnahme werden alle Frühgeborenen über einen Zeitraum von insgesamt 5 Jahren bezüglich ihrer körperlichen und neurologischen Entwicklung nachbeobachtet. Innerhalb dieser 5 Jahre gibt es zwei zeitliche Endpunkte für die klinische Datenerhebung. Der erste Endpunkt umfasst den stationären Aufenthalt unmittelbar nach der Geburt. Mit Entlassung des Kindes sind bereits zentrale Outcomeparameter (z. B. Tod, Sepsis mit positiver Blutkultur, Hirnblutung, Operation aufgrund von Komplikationen) in Form von standardisierten Erhebungsbögen (CaseReportForms, CRFs) erfasst (Anhang 7.1). Im Rahmen des postnatalen Klinikaufenthaltes werden zudem die erforderlichen Bioproben zur DNS-Isolierung gewonnen. Dies beinhaltet 4 Mundschleimhautabstriche (jeweils 2 von Mutter und Kind) sowie ein kurzes Stück der Nabelschnur (konserviert bei -20 °C). Die gesamte Probenverarbeitung findet in den Laboren der Studienzentrale statt. Im Weiteren werden, in einem Abstand von jeweils 12 Monaten, über 5 Jahre Fragebögen an die Familien nach Hause versendet. Der letzte Fragebogen mit 48-60 Monaten bildet den zweiten zeitlichen Endpunkt, der bei einem Teil der eingeschlossenen Kinder mit einer Nachuntersuchung kombiniert ist. Es erfolgt eine zufällige telefonische Einladung der Familien, die Teilnahme an der 5-Jahres Follow up Untersuchung ist freiwillig. Ein Team der Studienzentrale (1 Arzt/Ärztin, 2 Studienassistenten/-innen, 1 Doktorand/-in) führt diese Nachuntersuchung in den jeweiligen Geburtskliniken der Kinder durch, um lange Anfahrtswege für die Familien zu vermeiden. In der Untersuchung werden folgende klinische Endpunkte durch genormte Messinstrumente erhoben: Körperlänge, Körpergewicht, Kopfumfang, Vitalwerte (Blutdruck, Puls, Atemfrequenz), Fein- und Grobmotorik, Visus, Stereosehen, Hörvermögen, Intelligenz (Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence, WPPSI-III) und die Lungenfunktion. Zudem werden in einem ärztlichen Interview das gelbe Heft, der Impfausweis und aktuelle Medikamentenlisten erfragt und anonymisiert kopiert. Um eine Vergleichbarkeit der erhobenen Daten zu

gewährleisten, werden sämtliche eingesetzten Materialien durch das Lübecker Team mitgebracht. Alle im GNN verwendeten Messinstrumente und Fragebögen sind standardisiert und an großen Kontrollgruppen gesunder Kinder geprüft. Die aktuell als Endpunkte definierten klinischen Werte werden genauso in internationalen Studien verwendet und durch die deutsche Fachgesellschaft für die Nachuntersuchung von Frühgeborenen empfohlen.

2.1.3 Messinstrumente und Softwareprogramme im 5-Jahres Follow up

In Tabelle 2 sind sowohl die Messinstrumente als auch die Softwareprogramme aufgelistet, die im Rahmen des 5-Jahres Follow up verwendet werden.

Tabelle 2: Messinstrumente und Softwareprogramme im 5-Jahres Follow up

Variable	Messinstrument, Firma	Softwareprogramm
Körpergewicht	ADE MAK Waage T7336, MeWa GmbH, Schwerin	
Körpergröße	Harpender Portable Stadiometer 603 VR, Holtain Limited, Crymych, England	
Kopfumfang	Plastik-Messband, Teilungslänge 0- 2000mm, DKSH Holding AG, Zürich, Schweiz	
Audiogramm	Titan™, Version 3.1, Interacoustics A/S, Middelfart, Dänemark	OtoAccess™, Version 1.2.1, Interacoustics A/S, Middelfart, Dänemark Titan Suite, Version 3.1.0.24, Interacoustics A/S, Middelfart, Dänemark
Lungenfunktion	Easy on-PC Spirometrie System, ndd Medizintechnik AG, Zürich, Schweiz TrueFlow Easy on-PC Sensor, ndd Medizintechnik AG, Zürich, Schweiz	Easy on PC, Version 2.2.0.14, ndd Medizintechnik AG, Zürich, Schweiz
Vitalparameter	Vital Signs Monitor VS-900, Mindray, Shanghai International, Holding Corp. GmbH, Hamburg	

Fein- und Grobmotorik	Movement Assessment Battery For Children-2 (M-ABC-2), Pearson PLC, London, England	
Intelligenzquotient	Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence III (WPPSI III), Version 2.0.3, Pearson PLC, London, England	WPSSI I-III Auswertungsprogramm, Version 1.0.2, Pearson Assessment & Information GmbH, Frankfurt/Main
Sehtest	LEA SYMBOLS® Single Symbol Book, Good Lite®, QNET B.V., Amsternade, Niederlande	
Tiefensehen	Lang Stereotest I®, Lang Stereotest AG, Küsnacht, Schweiz	

2.1.4 Datenbanken, Datenschutz und Monitoring

Sämtliche im GNN erhobenen Daten werden in den folgenden Datenbanken gespeichert:

- Excel Version 14.3.4, Microsoft, Seattle, USA
- MS-Office Access 2013, Microsoft, Seattle, USA
- SPSS Version 22.0, IBM, München

Um eine adäquate Verarbeitung der eingehenden Daten und deren Schutz zu gewährleisten, andererseits jedoch die Datensätze der eingeschlossenen Frühgeborenen über mindestens 5 Jahre im System vervollständigen zu können, arbeitet das GNN mit 2 Datenbanken. Die erste Datenbank enthält die personenbezogenen Daten (Geburtsdatum, Name, Anschrift, etc.), während in der zweiten Datenbank die dazugehörigen klinischen Daten gespeichert sind. Die Verknüpfung der beiden Datenbanken findet lediglich über eine Identifikationsnummer statt, sodass auf diesem Weg eine Pseudonymisierung der klinischen Daten erreicht wird. Die Eingabe der Daten (CRFs und Fragebögen) erfolgt, nach Eingang in die Studienzentrale, doppelt kontrolliert. Auch die gesammelten Proben werden mit der entsprechenden Nummer des Kindes versehen und auf diesem Wege der Pseudonymisierung zugeführt. Das Frühgeborenen-Netzwerk richtet sich mit seiner Art der Datenerhebung nach den Empfehlungen der „Good Clinical

Practice“, um die Durchführung prospektiver klinischer Studien zu ermöglichen. In einem Abstand von 12 Monaten werden die in den Zentren erhobenen Daten vor Ort durch eine(n) Studienarzt/-ärztin oder eine(n) Studienassistenten/-in in einem Monitoring geprüft. Ziel der Besuche ist die Qualitätssicherung der erhobenen Daten.

2.2 Studienpopulation und Definition der untersuchten Variablen

Zum Zeitpunkt der Datenerhebung und Datenauswertung dieser Arbeit waren 49 neonatologische Zentren aus der Bundesrepublik Deutschland Teil des Deutschen Frühgeborenen-Netzwerks. Die verwendeten klinischen Daten und Bioproben entstammen der GNN-Population aus den Einschlussjahren 2003 bis 2014 einschließlich. Als Einschlusskriterien galten in diesem Zeitraum ein Gestationsalter von $\leq 36 + 6$ Schwangerschaftswochen und ein Geburtsgewicht von < 1500 g. Die in dieser Arbeit untersuchten Variablen sind in der folgenden Tabelle definiert.

Tabelle 3: Untersuchte Variablen und ihre Definition

Variable	Definition
Small for Gestational Age (SGA)	Geburtsgewicht unter der 10. Perzentile nach Voigt et al. (Voigt et al., 2012)
Erythropoetin	Jegliche prophylaktische Therapie mit Erythropoetin zur Vermeidung einer Frühgeborenenanämie
Eisen	Jegliche Eisentherapie während des postnatalen Stationsaufenthaltes.
Bluttransfusion	Jegliche Bluttransfusion während des stationären Aufenthaltes
Probiotika	Orale Substitution von <i>Lactobacillus acidophilus</i> / <i>Bifidobacterium infantis</i> -Probiotika (optional anzugebende Variable auf den CRFs bis 2012, im Anschluss regelhaft abgefragtes Item)
Sepsis	Klinische Sepsis mit positiver Blutkultur

Nekrotisierende Enterokolitis (NEC)	Klinische NEC mit dem Bedarfe einer Laparotomie mit/ ohne Entfernung von nekrotischem Darm und der makroskopischen Diagnose einer NEC durch den Operateur.
Fokale intestinale Perforation (FIP)	FIP mit dem Bedarf einer Laparotomie und der makroskopischen Bestätigung einer isolierten FIP
Intraventrikuläre Hämorrhagie (IVH)	Jeglicher Grad der IVH entsprechend der Einteilung nach Papile et al. (Papile et al., 1978)
Retinopathia prematurorum (ROP)	ROP mit dem Bedarf einer operativen Versorgung oder Medikamentengabe in den Glaskörper
Tod	Tod während des stationären Aufenthaltes postnatal.

2.3 DNS-Isolierung

Für die Isolierung der Desoxyribonukleinsäure (DNS) wurden je zwei Mundschleimhautabstriche von Mutter und Kind entnommen sowie ein Stück der Nabelschnur. Vorteil der DNS-Isolierung aus den Mundschleimhautabstrichen war die kürzere Verarbeitungszeit, sodass aufgrund steigender Einschussraten primär dieses Verfahren gewählt wurde (seit 2012). Die zusätzliche Abnahme von Nabelschnur diente als Ausweichmöglichkeit, falls die Menge an gewonnener DNS aus den Mundschleimhautabstrichen nicht ausreichte.

Die DNS-Isolierung sowohl aus den Mundschleimhautabstrichen als auch aus der Nabelschnur erfolgte mithilfe von Probenverarbeitungsverfahren der Firma QIAGEN® (Hilden, Deutschland). Das QIAamp® 96 DNA Kit diente zur Isolation der DNS aus den Mundschleimhautabstrichen. Das Verfahren beruht auf einer selektiven Bindung der DNS an eine Silica-Gel Membran. Zur Freisetzung der DNS erfolgte zunächst eine Inkubation der Probe mit einer Protease, um die Proteindenaturierung zu erreichen. Da der DNS-Gehalt der Mundschleimhautproben erfahrungsgemäß eher gering war, wurde der Ansatz zur Stabilisierung der DNS zusätzlich mit einer phosphatgepufferten Salzlösung sowie einem AL-Puffer versetzt. Im Anschluss an die Inkubationszeit erreichte die Zugabe von absolutem Ethanol zum Probenansatz die Ausfällung der gewonnenen DNS. Die Reinigung der DNS erfolgte mithilfe von zwei aufeinanderfolgenden Waschschritten (Waschpuffer 1 und 2) kombiniert mit einer Zentrifugation. Der anfallende

Überstand konnte verworfen werden. Am Ende des Verfahrens verblieb die isolierte DNS am Boden der Deep-Well-Platte. In einem letzten Schritt wurde die DNS mit dem AE-Puffer für die weitere Verarbeitung konserviert.

Das Verfahren zur Isolation der DNS aus Nabelschnur benötigte 3 Tage. Verwendet wurde das Gentra® Puregene® Kit von QIAGEN®, da es sich für DNS-Proben mit hohem Molekulargewicht eignet. Die Isolierung erfolgt in diesem Fall über eine DNS-Präzipitation mittels Aussalzen. Zur Proteindenaturierung wurde die Nabelschnurprobe in Cell Lysis Solution, Proteinase K sowie Protein Precipitation Solution inkubiert. Nach der Inkubation wurde dem Ansatz zur Entfernung der Ribonukleinsäure RNase A Solution hinzugefügt. Nach Abschluss dieser Schritte konnte das am Boden des Röhrchens befindliche Protein-Pellet, nach Übertragung des DNS-Überstandes in ein neues Röhrchen, verworfen werden. Durch die Zugabe von Isopropanol 100 % in die DNS-haltige Lösung wurde die Löslichkeit überschritten und die DNS präzipitierte. Es folgten mehrere Waschungen mit Ethanol sowie eine Trocknung der DNS. Zuletzt wurde die DNS mit der DNA Hydration Solution gelöst und so konserviert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die DNS-Proben in 96er-Well-Platten bei -80 °C aufbewahrt. Bei jeder DNS-Isolation verblieben zuvor markierte Wells ohne DNS-Probe, um in der Polymerase Chain Reaction (PCR) in Form von Leerwerten als Kontrolle zu dienen.

Sämtliche Arbeitsschritte zur Isolation der DNS aus Mundschleimhautabstrichen und Nabelschnur sind den Protokollen in den Anhängen 7.2 und 7.3 zu entnehmen.

2.4 SNP-Auswahl

Polymorphismen der Gene HFE und TMPRSS6 haben einen starken Effekt auf das Serumeisen bei Erwachsenen europäischer Herkunft (Benyamin et al., 2009). Für die Durchführung unserer 2-Stichproben Mendelschen Randomisierungs-Studie verwendeten wir zwei Polymorphismen des Hämochromatose-Gens (HFE/rs1800562 und HFE/rs1799945) sowie einen Polymorphismus des Transmembranprotease Serin 6-Gens (TMPRSS6/rs855791). Alle drei Polymorphismen sind mit der Expositionsvariable Serumeisen mit einem Signifikanzniveau von $p = < 5 \times 10^{-8}$ assoziiert und führen zu einem Anstieg des Eisens im Serum bei Erwachsenen. Sämtliche Daten zur Effektstärke der einzelnen SNPs entnahmen wir der Arbeit von Pichler et al. (Pichler et al., 2013). Die hier zugrundeliegende genomweite Assoziationsstudie (GWAS) umfasst 21.567 Individuen europäischer Herkunft.

Die Polymorphismen rs1800562 und rs1799945 des HFE-Gens liegen auf dem Chromosom 6 und kodieren das HFE-Protein. Jede Kopie des A-Allels von HFE/rs1800562 erhöht den Serumeisenspiegel um 0,37 Standardabweichung (95 % Konfidenzintervall 0,33-0,41, $p = 3,96 \times 10^{-77}$) und für jede Kopie des G-Allels von HFE/rs1799945 um 0,19 Standardabweichung (95 % Konfidenzintervall 0,17-0,21, $p = 1,65 \times 10^{-42}$). Rs855791 befindet sich auf dem Chromosom 22 im TMPRSS6-Gen und kodiert die Transmembranprotease Serin 6. Jede Kopie des G-Allels von TMPRSS6/rs855791 erhöht den Serumeisenspiegel bei Erwachsenen um 0,19 Standardabweichung (95 % Konfidenzintervall 0,17-0,21, $p = 4,31 \times 10^{-77}$). Die kombinierte F-Statistik der drei genetischen Instrumente liegt, entsprechend der Berechnungen von Pichler et al., bei 987 (Pichler et al., 2013).

In Tabelle 4 sind Details zu den gewählten Polymorphismen sowie der SNP-Eisen Assoziation inklusive Effektstärke, 95 % Konfidenzintervall und p-Wert aufgelistet. Die Informationen entstammen der Arbeit von Pichler et al. sowie der dbSNP-Datenbank. Die Allelfrequenz der einzelnen SNPs wurde anhand unserer Daten berechnet.

Tabelle 4: Details zu den Polymorphismen sowie die jeweilige SNP-Eisen-Assoziation

SNP	rs1800562	rs1799945	rs855791
Chromosom	6	6	22
Gen	HFE	HFE	TMPRSS6
Effektallel/ Wildtyp	A / G	G / C	G / A
Allelfrequenz	0,03	0,13	0,50
Effektgröße Beta (95 %-KI)	0,37 (0,33-0,41)	0,19 (0,17-0,21)	0,19 (0,17-0,21)
p-Wert	3,96 x 10 ⁻⁷⁷	1,65 x 10 ⁻⁴²	4,31 x 10 ⁻⁷⁷

Quellen: Pichler et al., 2013; dbSNP

2.5 Genotypisierungsanalyse

Zur Genotypisierung der isolierten DNS im Hinblick auf die eisensteigernden SNPs wurde eine fluoreszenzbasierte Polymerase Chain Reaction (PCR) mit anschließender allelischer Diskriminierung vorgenommen. Vor Beginn der PCR-Amplifikation wurden die DNS-Proben von vier 96er-Well-DNS-Platten (Sarstedt, Nürnbrecht) mithilfe einer Achtkanalpipette (Eppendorf® Xplorer) in eine 384er-Well-DNS-Platte (Sarstedt) übertragen. Dabei war die Vorlage von 1 µl isolierter DNS aus Nabelschnur ausreichend, während 2 µl vorgelegt wurden, wenn es sich um die geringer konzentrierte DNS aus Mundschleimhautabstrichen handelte. In jedem der 384 Wells befand sich folglich die isolierte DNS von genau einem Frühgeborenen. Im Weiteren wurde zu jeder DNS-Probe 5 µl PCR-Ansatz mit der Eppendorf® Multipette Stream mit Combitips advanced pipettiert. Der PCR-Ansatz enthielt alle relevanten Komponenten für das anschließende Thermocycling. Dies umfasste zum einen Ampuwa® (Fresenius Cabi, Bad Homburg) und den TaqMan® Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). Zum anderen beinhaltete der PCR-Ansatz die fluorogenen Sonden (Applied Biosystems, Life Technologies), die an das jeweilige gesuchte Allel (SNP oder Wildtyp) hybridisierten. Nach Zugabe des PCR-Ansatzes enthielt das Well neben 1 µl oder 2 µl DNS, 2,425 µl Ampuwa®, 2,525 µl TaqMan® Genotyping Master Mix und 0,05 µl der fluorogenen Sonden. Das Probenvolumen umfasste demnach 6 µl

in den Wells mit Nabelschnur-DNS und 7 µl, wenn die isolierte DNS aus dem Mundschleimhautabstrich stammte. Nach dem luftdichten Verschluss der 384er-Well-DNS-Platte mit Sealing Tape (Sarstedt) und Zentrifugation (Rotanta 46 RSC, Hettich Zentrifugen) wurde die PCR gestartet (Cycler: Veriti 384 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems; Peltier Thermal Cycler-200, MJ Research; TaqMan® 7900HT, Applied Biosystems). Grundlegend für die Bestimmung des Genotyps der Probe war die Verwendung von je einer speziellen Sonde pro gesuchtes Allel. Die Sonde bildete die entsprechende Komplementärsequenz zum Allel. Jede Sonde war mit einem Reporter-Farbstoff markiert, der in einer individuellen Wellenlänge fluoreszierte. Auf diesem Wege konnte bestimmt werden, ob es sich bei der untersuchten Probe um einen homozygoten Genotyp für das Allel 1 (z. B. gesuchter SNP), einen homozygoten Genotyp für das Allel 2 (z. B. Wildtyp) oder um einen heterozygoten Genotyp handelte. Der Reporter-Farbstoff befand sich stets am 5'-Ende jeder Sonde. Es wurden FAM™ (6-Carboxyfluorescein) und VIC® (Patent von Applied Biosystems) als Reporter-Farbstoffe verwendet. Am 3'-Ende der Sonde war ein nicht-fluoreszierender Quencher (NFQ) lokalisiert. Band nun die Sonde an ihre spezifische Zielsequenz zwischen dem Forward- und Reverse-Primer, so wurde sie durch eine Taq-DNS-Polymerase gespalten. In der Folge dissoziierte der Reporter-Farbstoff von der Sonde unter Verstärkung seines Fluoreszenzsignals. Fand die Sonde ihre Zielstruktur jedoch nicht und blieb intakt, so wurde die abgestrahlte Fluoreszenz des Reporters durch die Nähe zum Quencher aufgrund des Fluoreszenzresonanzenergietransfers (FRET; Förster-Resonanz) gemindert und das Signal konnte nicht gemessen werden (StepOne™ Real-Time PCR System, 2010 Applied Biosystems; Abbildung siehe Anhang 7.4). Ein PCR-Zyklus durchläuft die Phase der Denaturierung, des Annealings und der Elongation. Zuvor beschriebener Mechanismus fand in der Phase des Annealings (Phase 2) und der Elongation (Phase 3) statt. Um durch eine ausreichende Amplikonanzahl der gesuchten Allele eine signifikante Fluoreszenzintensität zu erreichen, wurden bei den Nabelschnur-DNS-Proben insgesamt 40 PCR-Zyklen durchgeführt und bei den DNS-Proben aus den Mundschleimhutanstrichen 45.

Nach Abschluss der PCR erfolgte die allelische Diskriminierung basierend auf der Messung des Wellenlängenprofils einer jeden Probe. Sowohl der homozygote Wildtyp als auch ein, für die untersuchten SNPs homozygoter Merkmalsträger

zeigte entsprechend des oben geschilderten Verfahrens nur einen Ausschlag bei dem Wellenlängenbereich des Farbstoffes VIC® oder FAM™. Ein heterozygoter Genotyp wies hingegen Ausschläge bei zwei Wellenlängenbereichen auf. Für die Messung wurde die Sequence Detecting System-Software (Applied Biosystems) im TaqMan® verwendet. Die Daten wurden in einem Koordinatensystem entsprechend ihrer Allelzugehörigkeit in Gruppen dargestellt. Zudem konnte der Graphik die quantitative Allelhäufigkeit entnommen werden. Einzelne Proben, die von der Software keinem eindeutigen Wellenlängenbereich zugeordnet wurden, erhielten die Kennzeichnung „X“. Hier war zum Teil eine manuelle Zuordnung möglich, wenn die Probe aufgrund ihres Abstands klar einer Allelwolke zugeordnet werden konnte (Abbildung siehe Anhang 7.5).

Zuvor markierte Wells ohne DNS-Probe dienten als Negativkontrolle (NTC; No Template Control), um die Qualität der Messungen zu kontrollieren. Aufgrund fehlender fluoreszierender Farbstoffe durften diese NTCs keinen Ausschlag zeigen. Die 384er-Well-DNS-Platte wurde verworfen sobald sich zwei oder mehr Verunreinigungen zeigten und die Analyse für die entsprechenden DNS-Proben wiederholt.

2.6 Statistik

Das Studienprotokoll des Frühgeborenen-Netzwerks sieht keine Blutentnahmen bei den eingeschlossenen Kindern vor, sodass zu keinem Probanden und keiner Probandin ein laborchemisch bestimmter Serumeisenwert vorlag. Zur Untersuchung unserer Fragestellung wählten wir daher den Ansatz einer genomweiten Assoziationsstudie basierten 2-Stichproben Mendelschen Randomisierung. Für jeden einzelnen Polymorphismus wurde der Effekt auf das Outcome von Interesse (NEC-Operation) separat berechnet.

2.6.1 Mendelsche Randomisierung

Die Mendelsche Randomisierung (MR) ist eine effektive Methode um die Kausalität einer Exposition-Outcome Assoziation in einer Beobachtungsstudie zu

erschließen, falls die Exposition nicht gemessen werden kann, analog zu einer randomisiert kontrollierten Studie. Dafür werden ein oder mehrere genetische Varianten als Proxy für die Expositionsvariable von Interesse verwendet, deren Effekt in einer GWAS ermittelt wurde. Ist die genetische Variante „X“ (hier SNPs rs1800562, rs1799945 und rs855791) kausal mit der interessierten Expositionsvariable „Y“ (hier Serumeisenspiegel) verknüpft und wirkt die genetische Variante „X“ nur durch den Effekt der Expositionsvariable „Y“ auf das Outcome „Z“ (hier NEC-OP), so repräsentiert dies indirekt eine kausale Assoziation zwischen Y und Z. Damit die Mendelsche Randomisierung angewendet werden darf, sollten drei Annahmen erfüllt sein: 1. Die genetische Variante „X“ hat eine wahre Assoziation mit der interessierten Exposition „Y“. 2. Die genetische Variante „X“ sollte unabhängig vom Outcome „Z“ sein. 3. Die genetische Variante „X“ sollte nicht assoziiert sein mit irgendeinem Confounder der Exposition-Outcome (Y-Z) Beziehung. Die zweite und dritte Annahme ist schwer zu überprüfen, da dies auch Assoziationen mit unbekannten Confoundern einbezieht (Grover et al., 2017). Zu beachten ist jedoch, dass genetische Merkmale im Rahmen der Vererbung zufällig in einer Population verteilt werden und bei jedem einzelnen Individuum lebenslang statisch sind. Durch die biologische Randomisierung ist das Risiko für eine Einflussnahme durch klassische Confounder folglich reduziert. Beobachtete „Ursache-Wirkungs“-Beziehungen können in einer Beobachtungsstudie durch den Bias der reversen Kausalität (reverse causality) limitiert sein. In MR-Studien schützt jedoch der Einsatz von genetischen Varianten als Surrogatparameter für die Exposition von Interesse vor einer Modifikation durch das Outcome von Interesse, da der individuelle Genotyp im Rahmen der Konzeption festgelegt wird und ein Leben lang unverändert bleibt (Libuda et al., 2019).

2.6.2 Weitere statistische Analysen

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit SPSS (Version 22.0; IBM, Armonk, NY, USA) sowie R (Version 3.3.1; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Die Auswertung fand in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck statt. Zur Berechnung der Outcome-Daten der TMPRSS6/rs855791, HFE/rs1800562 und HFE/rs1799945 Genotypen sowie der kombinierten Genotypen wurden der χ^2 -Test, der exakte Test nach Fisher sowie der t-Test verwendet. Die p-Werte aus diesen Berechnungen sind rein deskriptiv zu deuten. Die multiple logistische Regressionsanalyse verwendeten wir, um den Einfluss der genetischen Varianten „X“ auf das Outcome NEC-OP „Z“ zu berechnen. Dabei wurde für Geschlecht und Gestationsalter adjustiert. Zudem erfolgte eine logistische Regressionsanalyse zur Berechnung der TMPRSS6/rs855791-NEC-OP Assoziation separat betrachtet für die Subgruppen *keine Probiotikatherapie* und *Probiotikatherapie*. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 gesetzt und alle p-Werte sind zweiseitig. Eine Kontrolle für multiples Testen erfolgte mittels Bonferroni-Holm.

2.7 Ethikvoten

Das Ethikvotum für das German Neonatal Network mit dem Studiensitz am Universitätsklinikum Lübeck (UKSH, Campus Lübeck) liegt vor (Aktenzeichen der Ethikkommission Lübeck 08-022, Datum des Ethikvotums: 27.06.2008). Ebenso wurde für jede teilnehmende Klinik separat ein Ethikvotum beantragt und diesem stattgegeben.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die DNS von insgesamt 12.342 Kindern mit einem Gestationsalter von $< 37 + 0$ SSW und einem Geburtsgewicht < 1500 g für jeden der drei ausgewählten SNPs genotypisiert. Die Untersuchung des SNP rs855791 war für 95,7 % ($n = 11.780$) der Proben erfolgreich, bei rs1800562 für 95 % ($n = 11.688$) und bei dem SNP rs1799945 für 95,8 % ($n = 11.801$) der Proben. Die sich anschließenden Analysen wurden nur bei den Studienteilnehmern/-innen durchgeführt, die eine erfolgreiche Genotypisierung aller drei Polymorphismen aufwiesen. Unter dieser Voraussetzung konnten 90,5 % ($n = 11.166$) der DNS-Proben in die Berechnungen eingeschlossen werden. Zum Zeitpunkt der Auswertung waren für 946 der 11.166 Kinder Daten zum 5-Jahres Follow up vorhanden.

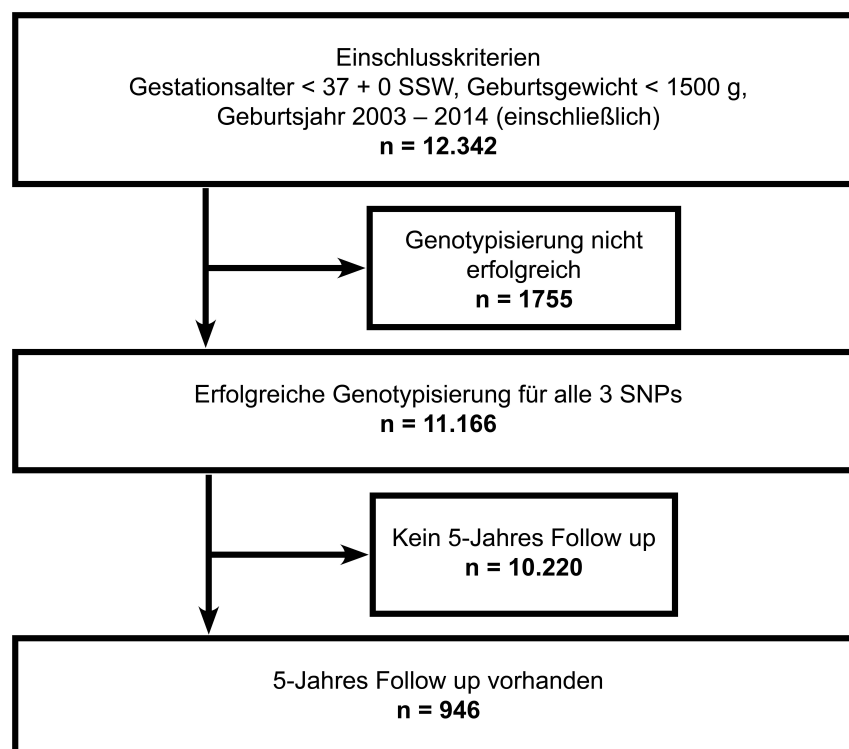


Abbildung 2: Flussdiagramm mit den Zahlen der eingeschlossenen Kinder in die GNN-Studie, den Absolutwerten der erfolgreichen Genotypisierungen für alle 3 SNPs sowie die Anzahl der nachuntersuchten Kinder im Rahmen des 5-Jahres Follow up.

Daten zur medikamentösen Behandlung und zum Outcome der Frühgeborenen waren für alle 11.166 Patienten vorhanden. Angesichts fehlender Angaben seitens der entlassenden Kliniken, blieben die Datensätze der einzelnen Studien-

teilnehmer/-innen zum Teil unvollständig hinsichtlich aller abgefragten Merkmale. Entsprechende Informationen finden sich unter den jeweiligen Tabellen. Die Berechnungen wurden für die fehlenden Nennungen korrigiert und erklären ein Nichterreichen der 11.166 Proben in manchen Datensätzen. 281 der 11.166 Kinder bedurften einer Operation in Folge einer nekrotisierenden Enterokolitis. Dies entspricht einem Anteil von 2,5 % (281/11.166).

3.1 Klinische Daten der Gesamtkohorte

In der Tabelle 5 sind die klinischen Daten der untersuchten Kohorte aufgezeigt. Es wurden die Variablen Geburtsgewicht, Gestationsalter, männliches Geschlecht, Mehrlingsgeburt und SGA zur näheren Beschreibung ausgewählt.

Tabelle 5: Klinische Daten der Gesamtkohorte

Klinische Daten	n = 11.166 ^a
Gestationsalter (Wochen)	28,7 ± 2,7
Geburtsgewicht (g)	1064 ± 302
Männliches Geschlecht	51,1
Mehrlingsgeburt	33,6
SGA	17,9

SGA, small for gestational age.

Werte angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung oder %.

^aFehlende Daten: Gestationsalter n = 2; SGA n = 3

3.2 Ergebnisse der Mendelschen Randomisierung

Es wurde anhand jedes einzelnen Polymorphismus die Odds Ratio für das Risiko der NEC-Operation pro SD-Einheit gesteigertem Serumeisenspiegel mithilfe der Mendelschen Randomisierung berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 dargestellt. Im oberen Feld sind die zu untersuchenden genetischen Varianten mit dem mutierten Allel und dessen Frequenz zu sehen. Auf der linken Seite ist die Erhöhung des Serumeisens bei Erwachsenen pro Effekttallel in Standardabweichungen angegeben. Die Ergebnisse zur Effektstärke der einzelnen Risikoallele auf den Serumeisenspiegel entnehmen wir aus der Arbeit von Pichler et al. (Pichler et al., 2013). Rechts im Bild ist das, mittels multipler logistischer Regression berechnete, Chancenverhältnis zwischen dem Risiko der NEC-Operation pro mutiertes Allel dargestellt. Pro SNP wurde eine multiple logistische Regression berechnet, wobei die Variablen Geschlecht und Gestationsalter jeweils zur Korrektur der Ergebnisse für diese Einflussgrößen in das Modell eingegangen sind. Im unteren Teil der Abbildung finden sich die Ergebnisse der Mendelschen Randomisierung bezogen auf den Einfluss der genetisch veränderten Serumeisenspiegel auf das Risiko der NEC-Operation.

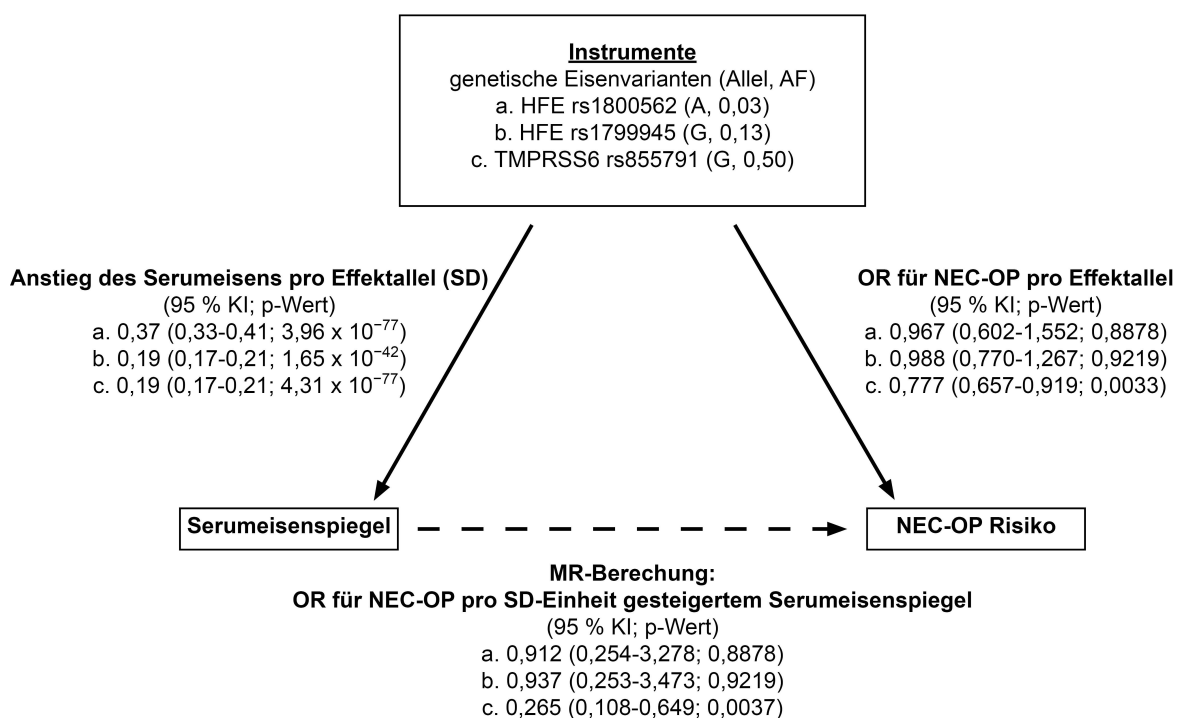


Abbildung 3: Ansatz der Mendelschen Randomisierung (nach Pichler et al., 2013)

Es zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen TMPRSS6/rs855791 und einem reduzierten Risiko für eine NEC-Operation mit einer OR von 0,78 (95 % Konfidenzintervall 0,66-0,92, nominales $p=0,003$) je Kopie des G-Allels. Basierend auf dem rs855791 Polymorphismus ergab die Berechnung der Mendelschen Randomisierung ebenfalls eine statistisch signifikante Schätzung für ein reduziertes Risiko einer NEC-Operation pro SD-Einheit erhöhten Serumeisens mit einer OR von 0,27 (95 % Konfidenzintervall 0,11-0,65, nominales $p=0,004$, adjusted $p=0,011$). Ein signifikanter Zusammenhang zwischen den HFE-Polymorphismen rs1800562 sowie rs1799945 und dem Risiko der NEC-Operation konnte nicht nachgewiesen werden.

3.3 Klinische Daten aufgeschlüsselt für die TMPRSS6/rs855791 Genotypen

Wir untersuchten daraufhin sämtliche klinische Basisdaten sowie Angaben zu Therapie und Outcome von TMPRSS6/rs855791 hinsichtlich eines signifikanten Unterschieds zwischen den einzelnen Allelgruppen. Entsprechend der Allelverteilung ergaben sich folgende drei Gruppen. Der Genotyp AA ($n=2193$) assoziiert mit einem niedrigen Serumeisenspiegel und konsekutiv erhöhtem intestinalen Eisen, der heterozygote Genotyp AG ($n=5384$) mit intermediären Werten für Eisen im Serum und im Darm sowie der homozygote Genotyp GG ($n=3589$) mit hohem Serumeisen und niedrigen Eisenkonzentrationen im Darm. Die Tabelle 6 dient der Präsentation der klinischen Basisdaten (Gestationsalter, Geburtsgewicht, männliches Geschlecht und SGA) der TMPRSS6/rs855791 Genotypen. Das Kollektiv wies eine gleichmäßige Verteilung der Merkmale sowohl im Vergleich der einzelnen Genotypen auf als auch in der vergleichenden Betrachtung mit den Ergebnissen aus der Gesamtkohorte. Ein signifikanter Unterschied zwischen dem Genotyp AA und dem Genotyp GG für Gestationsalter, Geburtsgewicht, männliches Geschlecht, Mehrlingsgeburt und SGA konnte nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 6: Klinische Daten aufgeschlüsselt für die TMPRSS6/rs855791 Genotypen

rs855791 Genotyp	AA (niedriges Serumeisen/ hohes intestinales Eisen) n = 2193	AG (Intermediäres Serumeisen/ intermediäres intestinales Eisen) n = 5384	GG (hohes Serumeisen/ niedriges intestinales Eisen) n = 3589	Total^a n = 11.166
Gestationsalter (Wochen)	28,7 ± 2,6	28,7 ± 2,7	28,7 ± 2,7	28,7 ± 2,7
Geburtsgewicht (g)	1056 ± 302	1069 ± 303	1061 ± 303	1064 ± 302
Männliches Geschlecht	50,6	51,4	50,9	51,1
Mehrlingsgeburt	34,4	33,4	33,3	33,6
SGA	18	17,7	18,2	17,9

SGA, small for gestational age. Werte angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung oder %. Statistische Auswertung: χ^2 -Test und t-Test. Kein signifikanter Unterschied ($p = < 0,05$) zwischen dem Genotyp AA und GG. ^aFehlende Daten: Gestationsalter n = 2, SGA n = 3.

3.4 Therapiedaten aufgeschlüsselt für die TMPRSS6/rs855791 Genotypen

Die Tabelle 7 zeigt die prozentuale Häufigkeit einer medikamentösen Behandlung mit Erythropoetin, Eisen, der Transfusion eines Blutproduktes sowie Probiotika je Allelgruppe.

Tabelle 7: Therapiedaten aufgeschlüsselt für die TMPRSS6/rs855791 Genotypen

rs855791 Genotyp	AA (niedriges Serumeisen/ hohes intestinales Eisen) n = 2193	AG (Intermediäres Serumeisen/ intermediäres intestinales Eisen) n = 5384	GG (hohes Serumeisen/ niedriges intestinales Eisen) n = 3589	Total^a n = 11.166
Erythropoetin	13,2	13,3	13,3	13,3
Eisen	85,5	85,6	86,6	85,9
Transfusionen	40,7	40,2	39,8	40,2
Probiotika	40,2	40,4	42,5	41,0

Werte angegeben in %. Statistische Auswertung: χ^2 -Test. Kein signifikanter Unterschied ($p = < 0,05$) zwischen dem Genotyp AA und GG.

^aFehlende Daten: Erythropoetin n = 38, Eisen n = 3, Transfusionen n = 16, Probiotika n = 3.

Die Daten wurden ebenfalls für die drei TMPRSS6/rs855791 Genotypen aufgeschlüsselt. Im Vergleich der Spaltenmittel ergab sich keine statistische Signifikanz für eine differente Behandlung zwischen den Genotypen AA und GG.

3.5 Daten zum kurzfristigen Outcome aufgeschlüsselt für die TMPRSS6/rs855791 Genotypen

Die Daten zum kurzfristigen Outcome der TMPRSS6/rs855791 Genotypen sind in Tabelle 8 dargestellt. Es wurden die Variablen Sepsis, NEC, FIP, IVH, ROP und Tod während des stationären Aufenthaltes untersucht.

Tabelle 8: Daten zum kurzfristigen Outcome aufgeschlüsselt für die TMPRSS6/rs855791 Genotypen

rs855791 Genotyp	AA (niedriges Serumeisen/ hohes intestinales Eisen) n = 2193	AG (Intermediäres Serumeisen/ intermediäres intestinales Eisen) n = 5384	GG (hohes Serumeisen/ niedriges intestinales Eisen) n = 3589	Total ^a n = 11.166
Sepsis	12,4	13,3	12,8	13,0
NEC	<u>3,1</u>	<u>2,6</u>	<u>2,0</u>	2,5
FIP	1,7	2,3	1,9	2,0
IVH	17,3	17,2	16,2	16,9
ROP	3,2	3,2	3,6	3,3
Tod	3,2	3,1	3,3	3,2

NEC, nekrotisierende Enterokolitis; FIP, fokale intestinale Perforation; IVH, intraventrikuläre Hämorrhagie; ROP, Retinopathia praematurorum. Werte angegeben in %. Statistische Auswertung: χ^2 -Test und exakter Test nach Fisher. Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen Genotyp GG vs. AA fett und unterstrichen.

^aFehlende Daten: Sepsis = 66, FIP n = 18, IVH n = 13, ROP = 6.

Im Rahmen der Ergebnisinterpretation für den Endpunkt NEC zeigte sich, passend zu den berechneten Assoziationen der Mendelschen Randomisierung, eine signifikant höhere Anzahl an NEC-Operationen je niedriger der Serumeisenspiegel und entsprechend erhöht die intestinale Eisenkonzentrationen war. Frühgeborene mit einem AA-Genotyp (niedriges Serumeisen, hohes intestinales Eisen) wiesen

mit 3,1 % die höchste NEC-Operationsrate auf. Die NEC-Operationsrate bei Kindern mit dem heterozygoten Genotyp AG (intermediäres Serumeisen, intermediäres intestinales Eisen) war intermediär (2,6 %) und die Subgruppe der Frühgeborenen mit dem Genotyp GG (hohes Serumeisen, niedriges intestinales Eisen) hatte die geringste NEC-Operationsrate mit 2,0 % (OR für AA gegen GG 0,62, 95 % Konfidenzintervall 0,44-0,87, $p = 0,006$, exakter Test nach Fisher). Für 135 der 281 Kinder (48 %) war der Zeitpunkt der ersten NEC-Operation bekannt (Variable erfragt seit 2011). Im Mittel waren die Kinder bei der primären Operation 18 Tage alt (Interquartilabstand: Lebenstag 10-31). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Kindern mit unterschiedlichem Genotyp.

Das Risiko für die Entwicklung einer Sepsis, FIP, IVH oder ROP war in den Subgruppen gleichmäßig verteilt. Es ergab sich ebenfalls kein Unterschied zwischen den einzelnen Genotypen in Bezug auf die abgefragte Variable Tod während des stationären Aufenthaltes.

Die Tabellen 9 und 10 (Anhang 7.6 und 7.7) präsentieren die klinischen Basisdaten sowie Angaben zu Therapie und Outcome für die HFE-Polymorphismen rs1799945 und rs1800562. Genau wie für den TMPRSS6-Polymorphismus wurde der rs1799945 beziehungsweise der rs1800562 Genotyp in die einzelnen Allelsubgruppen eingeteilt und jede untersuchte Variable auf einen signifikanten Unterschied zwischen dem homozygoten Wildtyp (rs1799945: CC; rs1800562: GG) und dem homozygoten Mutanten (rs1799945: GG; rs1800562: AA) geprüft. Für den rs1799945 Genotyp konnte weder in den Basisdaten noch in den erfragten Variablen aus dem Bereich Therapie und Outcome ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Alleltyp mit hohem Serumeisen und niedrigem intestinalen Eisen (GG) und dem Genotyp mit niedrigem Serumeisen und konsekutiv hohem intestinalem Eisen (CC) dargestellt werden. Hingegen wiesen die Kinder mit der homozygoten Allelverteilung AA (hohes Serumeisen, niedriges intestinales Eisen) des rs1800562 Genotyps ein signifikant höheres Gestationsalter und Geburtsgewicht im Vergleich zu den Allelsubtypen AG (intermediäres Serumeisen, intermediäres intestinales Eisen) und GG (niedriges Serumeisen, hohes intestinales Eisen) auf. Weitere signifikante Unterschiede zeigten sich nicht.

3.6 Effektstärke der kombinierten Genotypen

Zur Schätzung der kombinierten Effektstärke auf das Risiko der NEC-Operation wurden die Studienteilnehmer und Studienteilnehmerinnen, entsprechend ihrer individuellen Anzahl eisensteigernder Allele, einem von drei möglichen Phänotypen zugeteilt. Bei keinem der Patienten konnten mehr als 4 mutierte Allele nachgewiesen werden, daher wurden die Phänotypen wie folgt definiert. Bei fehlendem Nachweis einer eisensteigernden Mutation wurde der Patient unter dem Phänotyp *niedriges Serumeisen/hohes intestinales Eisen* ($n = 1473$, 13,2 %) geführt. Konnte mindestens ein rs1800562 A-Allel nachgewiesen werden, beziehungsweise ein oder zwei rs1799945 G-Allel(e) oder rs855791 G-Allel(e), so wurde das Kind dem intermediären Phänotypen (*intermediäres Serumeisen/intermediäres intestinales Eisen*) zugeteilt. Dies traf auf 8.095 Patienten (72,5 %) zu. Unter den Phänotyp *hohes Serumeisen/niedriges intestinales Eisen* fielen die Kinder mit zwei eisensteigernden Mutationen (davon mindestens ein rs1800562 A-Allel) oder 3-4 eisensteigernden Allelen ($n = 1598$, 14,3 %). Den geschätzten Serumeisenspiegeln näherten wir uns durch die Addition der Standardabweichungen der adulten Serumeisenspiegel entsprechend der Allelverteilung jedes einzelnen Kindes. Damit lag der maximale Serumeisenspiegel $+0,62$ SD (Mittelwert der berechneten Standardabweichungen in der Subgruppe *hohes Serumeisen/niedriges intestinales Eisen*) über dem der Kinder ohne eisensteigernde Mutation. Bei dem intermediären Phänotyp waren es $+0,28$ SD (Mittelwert der berechneten Standardabweichungen in der Subgruppe *intermediäres Serumeisen/ intermediäres intestinales Eisen*). Im Vergleich zu den Ergebnissen des TMPRSS6/rs85579 Genotyps konnte die negative Assoziation eines genetisch gesteigerten Serumeisenspiegels auf das Risiko der NEC-Operation in den kombinierten Daten der drei Polymorphismen noch stärker herausgearbeitet werden. Unter einem genetisch bedingten hohen Serumeisenspiegel war die Rate der NEC-Operation signifikant niedriger als bei Kindern ohne eisensteigernde Mutation (3,2 % vs. 1,8 %, OR 0,54, 95 % Konfidenzintervall 0,34-0,87, $p = 0,010$, exakter Test nach Fisher). Dies entsprach einer reduzierten Chance einer NEC-Operation von circa 50 % gegenüber den Kindern mit dem homozygoten Wildtyp.

Tabelle 11: Daten zur Rate der NEC-Operationen aufgeschlüsselt für die kombinierten Genotypen

kombinierte Genotypen	Keine (niedriges Serumeisen/hohes intestinales Eisen) n = 1473	Ein oder zwei (Intermediäres Serumeisen/intermediäres intestinales Eisen) n = 8095	Zwei bis vier (hohes Serumeisen/niedriges intestinales Eisen) n = 1598	Total n = 11.166
NEC	<u>3,2</u>	<u>2,5</u>	<u>1,8</u>	2,5

NEC, nekrotisierende Enterokolitis. Wert angegeben in %. Statistische Auswertung: exakter Test nach Fisher. Signifikanter Unterschied ($p = < 0,05$) zwischen dem Genotyp „keine Mutation“ und „zwei bis vier“ Mutationen“, fett und unterstrichen.

Um das Gestationsalter, Geschlecht, Mehrlingsgeburt, maternale Herkunft, SGA, Behandlung mit Probiotika und die behandelnde Klinik als mögliche Confounder auf den gesehenen Effekt ausschließen zu können, berechneten wir eine logistische Regression, wobei die NEC-Operation die abhängige Variable darstellte. Der negative Einfluss der eisensteigernden Mutationen auf das Risiko der NEC-Operation blieb auch nach Korrektur für die genannten unabhängigen Variablen bestehen (OR pro zusätzlicher geschätzter SD des Serumeisens 0,44, 95 % Konfidenzintervall 0,22-0,88, $p = 0,020$).

Angaben zur Verteilung der klinischen Basisdaten für die kombinierten Genotypen finden sich in der Tabelle 12 (Anhang 7.8). Zusätzlich sind hier Daten zu medikamentösen Therapien sowie dem Outcome (Sepsis, FIP, IVH, ROP, Tod während des stationären Aufenthaltes) der Kinder aufgelistet. In Bezug auf diese Variablen ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Phänotyp *hohes Serumeisen/niedriges intestinales Eisen* und dem Phänotyp *niedriges Serumeisen/hohes intestinales Eisen*.

3.7 Effekt von TMPRSS6/rs855791 auf die Rate der NEC-Operationen für die Subgruppen Probiotikatherapie vs. keine Probiotikatherapie

Zur Betrachtung des Effektverhaltens des TMPRSS6/rs855791 Polymorphismus auf die Rate der NEC-Operation unter Berücksichtigung einer Probiotikatherapie berechneten wir getrennt für das Kollektiv *keine Probiotikatherapie* und *Probiotikatherapie* eine logistische Regression mit der NEC-OP Rate als abhängige Variable und dem TMPRSS6/rs855791 Genotyp als unabhängige Variable. Die Tabelle 13 zeigt die Anzahl der Kinder, die eine NEC-Operation

hatten, aufgeschlüsselt für die drei TMPRSS6/rs855791 Genotypen und das jeweilige Probiotikatherapieregime.

Tabelle 13: Effekt der TMPRSS6/rs855791 Genotypen auf die Rate der NEC-Operationen für die Subgruppen Probiotikatherapie vs. keine Probiotikatherapie

rs855791 Genotyp	AA (niedriges Serumeisen/ hohes intestinales Eisen)	AG (Intermediäres Serumeisen/ intermediäres intestinales Eisen)	GG (hohes Serumeisen/ niedriges intestinales Eisen)	Total	p-Wert
Keine Therapie mit Probiotika	<u>3,6</u> (47/1310)	<u>3,0</u> (97/3208)	<u>1,9</u> (39/2063)	2,8 (183/6581)	<u>0,002</u>
Therapie mit Probiotika	2,5 (22/882)	2,0 (44/2176)	2,1 (32/1524)	2,1 (98/4582)	0,592

NEC, nekrotisierende Enterokolitis. Werte angegeben in % oder in absoluten Zahlen. Statistische Auswertung: logistische Regression, separat durchgeführt für das Kollektiv „keine Probiotikatherapie“ und „Probiotikatherapie“. Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen dem Genotyp GG und AA, fett und unterstrichen.

Bei den Frühgeborenen ohne eine Therapie mit Probiotika zeigte sich ein signifikant höheres Risiko für die NEC-Operation bei einem AA-Genotyp des rs855791 Polymorphismus im Vergleich zum homozygoten Mutanten. Das Risiko für eine NEC-Operation steigerte sich pro A-Allel um 12 % (OR 1,12, 95 % Konfidenzintervall 1,08-1,70, $p = 0,002$). Dieser Effekt wurde in dem Kollektiv mit einer Probiotikatherapie nicht beobachtet (OR 1,08, 95 % Konfidenzintervall 0,88-1,33, $p = 0,592$).

3.8 Daten des 5-Jahres Follow up aufgeschlüsselt für die TMPRSS6/rs855791 Genotypen

Tabelle 14 zeigt die Daten des 5-Jahres Outcome dargestellt für den TMPRSS6/rs855791 Genotyp. Zum Zeitpunkt der Auswertung waren bereits 946 Kinder nachuntersucht. Es sind die Mittelwerte für die Körperlänge, das Körpergewicht, die Einsekundenkapazität sowie den Intelligenzquotienten für den jeweiligen Genotyp (AA, AG, GG) angegeben. Zudem die prozentuale Häufigkeit einer Zerebralparese für jede Allelkombination.

Tabelle 14: Daten des 5-Jahres Follow up aufgeschlüsselt für die TMPRSS6/rs855791 Genotypen

rs855791 Genotyp	AA (niedriges Serumeisen/ hohes intestinales Eisen) n = 191	AG (Intermediäres Serumeisen/ intermediäres intestinales Eisen) n = 471	GG (hohes Serumeisen/ niedriges intestinales Eisen) n = 284	Total^a n = 946
Körperlänge (cm)	111 ± 5,8	112 ± 5,3	111 ± 6,1	111 ± 5,7
Körpergewicht (kg)	17,6 ± 2,7	18,4 ± 3,2	18,1 ± 3,2	18,2 ± 3,1
FEV1 (%)	91 ± 15	88 ± 17	89 ± 17	89 ± 16
Zerebralparese	7,6	5,0	5,1	5,6
Intelligenzquotient	96 ± 15	97 ± 14	96 ± 14	97 ± 14

FEV1 %, Einsekundenkapazität. Werte angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung oder %. Statistische Auswertung: χ^2 -Test und t-Test. Kein signifikanter Unterschied ($p = < 0,05$) zwischen dem Genotyp AA und GG. ^aDie FEV1 % war von 750 Kindern verfügbar, der IQ von 862 Kindern. Für 895 Kinder waren Informationen bezüglich der Variable Zerebralparese verfügbar.

Für keine der Variablen ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem Kollektiv mit dem genetisch bedingten hohen Serumeisen (GG) und den Kindern mit einem niedrigen Serumeisen aufgrund des homozygoten Genotyps AA.

4. Diskussion

In dieser Arbeit untersuchten wir die Hypothese, ob eine genetisch veränderte enterale Eisenaufnahme kurzfristige oder langfristige Effekte auf das Outcome von Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g hat. Von besonderem Interesse war dabei die Betrachtung ob und inwiefern sich ein genetisch beeinflusstes, erhöhtes Serumeisen auf das Risiko einer operationsbedürftigen nekrotisierenden Enterokolitis auswirkt. Wir genotypisierten dafür die DNS von 12.342 Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht von unter 1500 g im Hinblick auf 3 Polymorphismen, die nachweislich die intestinale Eisenaufnahme bei Erwachsenen steigern. Nach erfolgreicher Genotypisierung für alle drei Polymorphismen konnten die Datensätze von 11.166 Kindern untersucht werden. 946 der 11.166 Kinder waren zum Zeitpunkt der Auswertung bereits im Rahmen des 5-Jahres Follow up zur Erhebung langfristiger Outcome-Daten untersucht worden.

4.1 Diskussion der Ergebnisse

Die Analyse der Daten zeigte, dass eine genetisch bedingt erniedrigte Eisenaufnahme aus dem Darm (und dementsprechend höhere intestinale Eisenkonzentrationen) assoziiert ist mit einem erhöhten Risiko für eine nekrotisierende Enterokolitis bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g. Frühgeborene mit dem eisensteigernden rs855791 G-Allel Polymorphismus (hohes Serumeisen, geringes intestinales Eisen) wiesen dementsprechend eine signifikant geringere Rate an NEC-Operationen auf.

4.1.1 Genetik und nekrotisierende Enterokolitis

Die Ätiologie der nekrotisierenden Enterokolitis ist multifaktoriell bedingt und neben zahlreichen klinischen Risikofaktoren gewinnt die Annahme einer zugrundeliegenden genetischen Prädisposition für die Entwicklung einer nekro-

tisierenden Enterokolitis zunehmend an Bedeutung. Passend zu dieser Arbeit beschreiben aktuelle Studien ebenfalls eine Gen-NEC-Assoziation. Beispielhaft sind die Arbeiten von Moonen et al. und Talavera et al. zu nennen. Die Forschungsgruppen beobachteten einen Effekt von Einzelnukleotidpolymorphismen in Genen mit regulatorischem Einfluss auf immunmodulatorische/inflammatorische Signalkaskaden beziehungsweise die intestinale Mikrozirkulation auf die Manifestation einer nekrotisierenden Enterokolitis (Moonen et al., 2020; Talavera et al., 2020). Eine isolierte genetische Störung ist aufgrund der hohen Komplexität der Erkrankung jedoch nicht anzunehmen, sondern vielmehr eine Interaktion aus klinischen und genetischen Risikofaktoren.

4.1.2 Eisen und Infektionen

Die Ergebnisse experimenteller Studien sowie Beobachtungsstudien stützen den von uns beobachteten, schädigenden Effekt hoher intestinaler Eisenkonzentrationen. Als zentrale Pathogenese wird hier eine eisenassoziierte mikrobielle Dysbalance im Darm mit konsekutiv erhöhter intestinaler Inflammation angenommen. Eisen ist ein essentieller Nahrungsbestandteil für nahezu alle humanpathogenen Mikroorganismen (Drakesmith und Prentice, 2012). Die Verfügbarkeit von Eisen kann die Virulenz der Pathogene maßgeblich beeinflussen (Armitage und Drakesmith, 2014). Passend dazu ergab sich im Rahmen mehrerer Studien der Hinweis auf eine gesteigerte Morbidität und Mortalität durch Infektionserkrankungen (z. B. Malaria und Tuberkulose) unter oraler Eisentherapie in Entwicklungsländern (Ganz und Nemeth, 2015). 2003 wurde eine großangelegte randomisiert Placebo-kontrollierte Studie an Kindern im Vorschulalter in einem Malariarisikogebiet auf Sansibar vorzeitig beendet, weil die Morbidität und Mortalität aufgrund von Infektionskrankheiten in der Interventionsgruppe (orale Eisensupplementation) signifikant höher im Vergleich zur Kontrollgruppe war (Sazawal et al., 2006). Betrachtet man gesondert die Assoziation von oraler Eisensupplementation und Diarrhoe, so ergibt sich aus den aktuellen Daten ein Trend hinsichtlich eines gesteigerten Risikos für eine Diarrhoe unter oraler Eisentherapie in Entwicklungsländern (Paganini und Zimmermann, 2017). Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse zweier randomisiert-kontrollierter

Doppelblindstudien an afrikanischen Kindern (Kenia und Elfenbeinküste) im Alter von 6 Monaten bis 14 Jahren führen als Grund für die gesteigerte enterale Morbidität eine Veränderung im Darmmikrobiom hin zu einem pathogeneren Profil an. Sowohl Jaeggi et al. als auch Zimmermann et al. maßen nach oraler Eisensupplementation einen Anstieg fakultativ pathogener Bakterien (Gamma-proteobakterien und *Clostridium perfringens*) sowie gesteigerte Spiegel an fäkalem Calprotectin, als Ausdruck intestinaler Inflammation. Die Darmintegrität schützenden Bakterien wie Lactobacillen und Bifidusbakterien nahmen hingegen in ihrer Anzahl ab (Zimmermann et al., 2010; Jaeggi et al., 2015).

4.1.3 Eisenassoziierte Veränderungen des Mikrobioms und die nekrotisierende Enterokolitis

Die Entstehung der nekrotisierenden Enterokolitis wird unter anderem auf eine mikrobielle Dysbalance im Darm zurückgeführt (Warner et al., 2016). Diese Hypothese stützend konnte, laut der Ergebnisse einer umfassenden Metaanalyse, bei einer Mehrzahl Frühgeborener mit NEC eine Zunahme von Proteobakterien sowie eine begleitende Abnahme von Firmicutes und Bacteroidetes im Stuhl gemessen werden, während diese Veränderung bei Kontrollkindern ohne eine NEC fehlten (Pammi et al., 2017). In der Zusammenschau lassen diese Ergebnisse sowie die im Unterkapitel 4.1.2 genannten Studienergebnisse den Schluss zu, dass sich eine erhöhte intestinale Eisenkonzentration negativ auf das Darmmikrobiom auswirkt und damit einen bisher unterschätzten Risikofaktor für die Entwicklung einer nekrotisierenden Enterokolitis darstellt.

Die Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) und die World Health Organization (WHO) definieren Probiotika als lebende Mikroorganismen, die zur Gesundheit des Wirts beitragen, wenn sie in einer angemessenen Menge verabreicht werden. International besteht der Konsensus, dass sich ein Großteil der Probiotika positiv auf die mikrobielle Balance des Darms auswirkt (Hill et al., 2014). Laut der Ergebnisse einer großen Metaanalyse des Cochrane-Netzwerks senkt der Einsatz von Probiotika die Inzidenz der schweren NEC (definiert als Bell-Stadium ≥ 2) (AlFaleh und Anabrees, 2014). Im Hinblick auf den, in der Literatur beschriebenen, prophylaktischen Effekt probiotischer Spezies lassen unsere

Daten Ähnliches vermuten. Ohne eine Therapie mit Probiotika ergab sich eine signifikant gesteigerte Rate an NEC-Operationen bei dem Genotyp AA (niedriges Serumeisen/hohes intestinales Eisen) im Gegensatz zum homozygoten Genotyp GG (hohes Serumeisen/niedriges intestinales Eisen). Unter einer Probiotikatherapie konnte dieser signifikante Effekt nicht mehr nachgewiesen werden. Es ist folglich anzunehmen, dass bestimmte probiotische Mikroorganismen, wie *Lactobacillus acidophilus* und *Bifidobacterium infantis* (Infloran®), den schädigenden Effekt von Eisen im Darm reduzieren. Einige *Lactobacillus* spezies (u.a. *Lactobacillus acidophilus*) sind in der Lage freies Fe^{2+} zu chelatieren, während eine Auswahl an *Bifidobacterium* spezies über Sequestrierung von Eisen die enterale Verfügbarkeit des Metalls für Pathogene reduziert (Sun et al., 2010; Paganini et al., 2017). Zudem scheinen Probiotika die Eisenspeicherung in Darmzellen zu begünstigen, was sich ebenfalls limitierend auf das Wachstum pathogener Mikroorganismen auswirken würde (Deschemin et al., 2016). Ein weiterer schützender Mechanismus seitens ausgewählter *Lactobacillus* spezies ist ein antioxidativer Effekt. Eine orale Eisensupplementation kann das Vorkommen freier Sauerstoffradikale insbesondere im Kolon steigern und somit schädigend auf das Darmendothel wirken. Sun et al. konnten zeigen, dass *Lactobacillus* spezies das Auftreten von Sauerstoffradikalen signifikant senken (Sun et al., 2010).

Lactobacillaceae sind eine der wenigen Organismen, die nur sehr wenig oder gar kein Eisen benötigen, sodass ihr mittleres Wachstum unabhängig vom Eisenangebot ist (Zimmermann et al., 2010). Unter hohen Eisenkonzentrationen können sie jedoch durch das gesteigerte Wachstum pathogener Mikroorganismen zügig verdrängt werden (Bailey et al., 2011). Es scheint daher ratsam von Monopräparaten mit *Lactobacillaceae* abzusehen. Laut aktueller Literatur ist die Verwendung von Kombinationspräparaten mit *Bifidobacteriaceae* und *Lactobacillaceae* am effektivsten (Thomas et al., 2017).

Sowohl das Risiko für eine nekrotisierende Enterokolitis als auch die Rate an NEC-Operationen ist bei Frühgeborenen unter exklusiver Ernährung mit Formelnahrung signifikant erhöht (Sullivan et al., 2010; Spiegler et al., 2016). Interessanterweise unterscheidet sich das Darmmikrobiom von Kindern mit reiner Formelnahrung im Vergleich zu Kindern mit einer Ernährung durch Muttermilch (Lönnerdal, 2014). So ist eine exklusive Diät mit Formelnahrung mit einer erhöhten Anzahl von Proteobakterien verbunden, welche in zahlreichen Studien mit einer

gesteigerten NEC-Inzidenz assoziiert sind (Elgin et al., 2016). Auch wenn der Pathomechanismus der Assoziation von Formelnahrung und NEC nicht gänzlich verstanden ist, so könnten die geringe Laktoferrinkonzentration sowie der hohe Gehalt an Eisen in Formelnahrung ein doppeltes Risiko darstellen, da beide Faktoren die Eisenkonzentration im Darm erhöhen. Der Eisengehalt in Formelnahrung ist zum Teil 10-60mal höher als in Muttermilch. Zudem enthält insbesondere Nahrung für Frühgeborene sehr viel Calcium, welches bei Erwachsenen die Eisenresorption aus dem Darm nachweislich reduziert (Lönnerdal et al., 2015). Ein wichtiges Protein in der Muttermilch ist Laktoferrin. Aufgrund der hohen Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau kann es in seiner aktiven Form multiple Funktionen übernehmen. Laktoferrin schützt durch seine hohe Bindungsaffinität kompetent das intestinale Eisen vor einer unerwünschten Aufnahme seitens pathogener Mikroorganismen. Des Weiteren ist die Eisenresorption unter Anwesenheit des Proteins gesteigert, da der Laktoferrin-Eisen-Komplex aktiv über den Laktoferrinrezeptor in die Intestinalzellen aufgenommen werden kann. Neben der aktiven Rolle im Eisenstoffwechsel wirkt Laktoferrin zusätzlich antibakteriell, antiviral sowie antiinflammatorisch (Lönnerdal, 2014). Laut aktueller Datenlage senkt die orale Supplementation von Laktoferrin bei enteral ernährten Frühgeborenen mit und ohne Probiotikatherapie sowohl die NEC-Rate (Bell Stadium II und III) als auch das Risiko für eine Late-onset-Sepsis ohne Nebenwirkungen (Pammi und Suresh, 2017).

Die Rate an Probiotika behandelten Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1500g steigt seit Jahren konstant (Aceti et al., 2018). Es ist folglich anzunehmen, dass durch die zunehmende Behandlungsrate der von uns gesehene negative Effekt der genetischen Varianten mit erhöhtem Risiko, in einer erneuten Analyse der GNN-Kohorte, in Zukunft reduziert beziehungsweise nicht mehr nachweisbar sein dürfte.

4.1.4 Langfristige Auswirkungen einer Eisentherapie bei VLBW Frühgeborenen

Bewertet man die Ergebnisse unserer Studie kritisch hinsichtlich des aktuellen Standards der Eisentherapie in der Neonatologie in Deutschland, so sind die

Daten in Bezug auf Teilaspekte des kurz- und langfristigen Outcomes in zweierlei Hinsicht beruhigend. So kann sich laut aktueller Forschungsergebnisse sowohl ein Eisenmangel als auch Eisenüberschuss negativ auf die neurophysiologische Entwicklung in der Perinatalzeit auswirken und das kurz- und langfristige neurologische Outcome nachhaltig beeinflussen (Amin et al., 2012). Kinder mit einem nachgewiesenen Eisenmangel in der Fetal- und Neonatalzeit zeigten im Verlauf schlechtere Ergebnisse in Bezug auf neurokognitive und sozial-emotionale Funktionen. Der nachteilige Einfluss eines Eisenmangels ist zum Teil dadurch zu erklären, dass zentrale chemische und metabolische Prozesse im Rahmen der neurologischen Differenzierung maßgeblich abhängig sind von Eisen (Lozoff und Georgieff, 2006). Hingegen wird hinter dem schädigenden Mechanismus des Eisenüberschusses der prooxidative Effekt des Spurenelementes vermutet sowie ein Mangel anderer essentieller Nährstoffe (z. B. Zink), die bei einem Überangebot an Eisen schlechter resorbiert werden (Lönnerdal et al., 2015). Die im GNN während der 5-Jahres Follow up Untersuchungen erhobenen Daten zum Langzeit-Outcome zeigten keinen Unterschied hinsichtlich der neurokognitiven Ergebnisse zwischen den Kindern mit hoher, intermediärer oder geringer Eisenaufnahme. Es ist folglich anzunehmen, dass sich unter der erfolgten oralen Eisentherapie weder schwere Mangelzustände noch ein schädigender Eisenüberschuss entwickelten. Gleichwohl ist zu beachten, dass zum Zeitpunkt der Auswertung erst 946 Kinder nachuntersucht wurden.

Ein weiterer beruhigender Aspekt ist das mittlere Alter der Frühgeborenen bei der ersten NEC-OP. Ausgehend von unseren Daten waren die betroffenen Kinder zum Zeitpunkt der ersten Operation 18 Tage alt. Gegenwärtig wird die orale Eisensubstitution jedoch in der Regel erst nach dem 18. Lebenstag begonnen, sodass ein Zusammenhang zwischen oraler Eisentherapie und der Entwicklung einer nekrotisierenden Enterokolitis unwahrscheinlich scheint. Die Sicherheit der oralen Eisensubstitution wird durch das Ergebnis diverser randomisiert kontrollierter Studien bestätigt, die ebenfalls keine Nebenwirkungen, insbesondere keine erhöhte Inzidenz einer nekrotisierenden Enterokolitis unter oraler Substitution von Eisen beobachten konnten (Franz et al., 2000; Taylor und Kennedy, 2013; Joy et al., 2014).

4.2 Diskussion der Methoden

Mit insgesamt 11.166 verwertbaren Datensätzen erreichten wir in unserer prospektiven Kohortenstudie eine sehr hohe Fallzahl. Die klar definierten Einschlusskriterien Frühgeburtlichkeit (Geburt < 37 Schwangerschaftswochen) und ein Geburtsgewicht unter 1500 g schützten vor einer individuell beeinflussten Auswahl der Studienteilnehmer und Studienteilnehmerinnen. Die Restriktion der Kohorte für diese Einschlusskriterien hatte den Vorteil, dass eine größere Heterogenität vermieden wurde, allerdings kann dadurch die Möglichkeit einer generalisierten Aussage zu der Patientengruppe der Frühgeborenen erschwert sein.

Betrachtet man die GNN-Kohorte im Hinblick auf die prozentuale Verteilung der maternalen Herkunftsländer, so ist diese repräsentativ für Deutschland. Die Prävalenz der untersuchten Polymorphismen HFE/rs1800562 und HFE/rs1799945 weist jedoch populationsbezogene Unterschiede auf (Brissot et al., 2018). Diesen Umstand gilt es, bei der Interpretation der gemessenen Häufigkeiten dieser Mutationen in unserer Studie, zu beachten.

Durch die Verwendung standardisierter Fragebögen sowie normierter Untersuchungsabläufe wird im GNN eine hohe Datenqualität erreicht sowie Informations-Bias vermieden. Die CRFs werden nur durch ärztliches Personal oder Study Nurses ausgefüllt. Trotzdem können durch zum Beispiel wechselndes Personal oder fehlende personelle Ressourcen Daten falsch bewertet oder fehlerhaft eingetragen sein. Um diese Art der Fehler zu minimieren, erfolgt jährlich ein Monitoring der teilnehmenden Kliniken durch ein geschultes Team des GNN. Durch die regelmäßigen Kontrollen wird zudem der Datenverlust suffizient reduziert. Die abgefragten Items der Elternfragebögen stimmen mit denen der KiGGS-Studie des Robert-Koch-Institutes überein, womit eine bessere Vergleichbarkeit sowie hohe Reproduzierbarkeit erreicht wird. Durch eine jährliche Versendung der Fragebögen und damit höheren Kontaktfrequenz zwischen der Studienzentrale und den eingeschlossenen Familien wird der Drop-out von Studienteilnehmern und Studienteilnehmerinnen gesenkt. Des Weiteren wird so der abgefragte Zeitraum in den Bögen kürzer, um einen Informationsverlust seitens der Eltern zu vermeiden. Nichtsdestotrotz können die Elternfragebögen

eine Fehlerquelle darstellen, da zum Beispiel Antworten auf den subjektiven Einschätzungen des Kindes seitens der Eltern beruhen, Fragestellungen durch fehlende Sprachkenntnisse nicht verstanden oder abgefragte Ereignisse nicht erinnert werden.

Durch die Standardisierung der Untersuchungen sowie der festen Aufgabenteilung innerhalb des Studienteams im 5-Jahres Follow up wird ebenfalls ein hoher Qualitätsgrad bei der Datenerhebung des Langzeitoutcomes der Frühgeborenen unter 1500 g erreicht. Leichte Unterschiede in der Beurteilung der Kinder sind jedoch nicht vollends auszuschließen. Aufgrund personeller und finanzieller Einschränkungen ist die 5-Jahres Nachuntersuchung nicht bei allen eingeschlossenen Kindern möglich. Es erfolgt eine zufällige telefonische Einladung, die Teilnahme ist freiwillig. Dies birgt die Gefahr eines Selektions-Bias, da möglicherweise vorrangig Eltern mit einem gewissen Bildungsgrad zusagen oder solche, deren Kind gesundheitlich geringer betroffen ist. Beide Punkte würden Einfluss auf das Gesamtergebnis des Langzeitoutcomes der Frühgeborenen nehmen und die Daten in eine falsch-positive Richtung verzerren.

Der zentrale analytische Ansatz unserer Arbeit beruht auf der Methode der Mendelschen Randomisierung. Sie ist eines der stärksten Instrumente, um den kausalen Zusammenhang zwischen zwei Variablen zu berechnen und gleichzeitig das Risiko von Confoundern in einer Beobachtungsstudie zu reduzieren (Grover et al., 2017). Durch den Einsatz genetischer Varianten (rs1800562, rs1799945, rs855791) als unabhängige biologisch randomisierte Surrogatparameter für den Expositionsfaktor Serumeisenspiegel ist unsere Berechnung größtenteils unbeeinflusst durch äußere Störfaktoren. Die tatsächliche Assoziation zwischen den genetischen Instrumenten und unserem Risikofaktor Serumeisenspiegel, welche eine Voraussetzung für die Durchführung der Mendelschen Randomisierung darstellt, wurde durch genomweite Assoziationsstudien bestätigt (Pichler et al., 2013; Sørensen et al., 2016). Sämtliche Erkenntnisse der Arbeiten von Pichler et al. und Sørensen et al. basieren auf Untersuchungen mit adulten Teilnehmern. Daten bezüglich konkreter Allele mit Effekten auf kindliche Serumeisenspiegel und Ferritinlevel wurden bisher nicht publiziert. Unsere Annahmen über die Auswirkung genetisch beeinflusster Eisenwerte im Blut und die damit veränderte intestinale Eisenaufnahme bei Frühgeborenen unter 1500 g

beruhen somit vollständig auf Erwachsenendaten, was die größte Limitation unserer Studie darstellt.

Der mögliche Einfluss des maternalen Genotyps auf den plazentaren Stoffwechsel stellt ebenfalls eine Limitation dar. Kürzlich veröffentlichte Daten von Karwowski et al. zeigen einen Effekt eines maternalen HFE-Polymorphismus auf den plazentaren Bleitransfer, wobei die Beeinflussung von relevanten Transportproteinen (z. B. HFE-Protein), die ebenfalls eine Rolle bei dem Eisentransfer von Mutter zu Kind spielen, als ätiologisch diskutiert werden (Karwowski et al., 2014). Folglich ist ein Effekt des maternalen Genotyps auf den Eisentransport zum Kind mit in Betracht zu ziehen.

Der Einfluss von HFE/rs1800562, HFE/rs1799945 und TMPRSS6/rs855791 auf den humanen Eisenstatus ist in der Literatur gut beschrieben. Trotzdem sind die zugrundeliegenden biologischen Prozesse, wie die genetischen Varianten die Eisenaufnahme erhöhen, aufgrund unzureichender funktionaler Nachweise zum jetzigen Zeitpunkt weitestgehend unbekannt. Pleiotrope Effekte der SNPs auf den Endpunkt NEC-Operation können daher nicht ausgeschlossen werden (Nai et al., 2011; Traglia et al., 2011; Galesloot et al., 2013). Das Mikrobiom von anämischen und nicht-anämischen Kindern unterscheidet sich in seiner Diversität. Zudem ist die Anämie ein beschriebener Risikofaktor für die Entwicklung einer nekrotisierenden Enterokolitis bei VLBW Frühgeborenen (Jaeggi et al., 2015; Patel et al., 2016). Dies gewinnt bei der kritischen Betrachtung einer möglichen Polyphänie des TMPRSS6 G-Allels an Bedeutung, da Letzteres auch das Hämoglobin steigert. Komplexe Parameter, wie Hämoglobin, werden in ihrer Gesamtheit jedoch nur geringfügig durch einzelne Punktmutationen beeinflusst (Van der Harst et al., 2012; Patel et al., 2016). Weitere Studien zur Klärung einer möglichen Assoziation zwischen Anämie und NEC sind wünschenswert, da insbesondere sehr kleine, unreife Frühgeborene regelhaft von einer Anämie betroffen sind (Franz et al., 2000).

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Unsere Daten zeigen einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem A-Allel des genetischen Polymorphismus rs855791 des TMPRSS6-Gens und einer erhöhten NEC Rate bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g. Das A-Allel des rs855791-Polymorphismus reduziert bei Erwachsenen die Serum-eisenspiegel. Es ist anzunehmen, dass die genetisch veränderte intestinale Eisenresorption einen Risikofaktor für die Entwicklung einer mikrobiellen Dysbalance im Darm und einer NEC darstellt. Diese Assoziation konnte bei dem Frühgeborenenkollektiv mit einer Probiotikatherapie mit *Lactobacillus acidophilus* und *Bifidobacterium infantis* hingegen nicht mehr beobachtet werden, sodass von einem schützenden Effekt der Probiotikatherapie auszugehen ist. Die aktuell gängige klinische Praxis der Eisentherapie bei Frühgeborenen wird durch die Ergebnisse unseres 5-Jahres Follow up unterstützt, da sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Kindern mit hoher intestinaler Eisenaufnahme im Vergleich zu den Kindern mit intermediärer und niedriger intestinaler Eisenaufnahme in den betrachteten Endpunkten ergab. Zudem lag der Zeitpunkt der Diagnosestellung einer NEC im Mittel vor dem Beginn einer iatrogen verordneten oralen Eisentherapie. Die nekrotisierende Enterokolitis als Folge der oralen Eisensubstitution scheint damit ebenfalls unwahrscheinlich. Einschränkend ist darauf hinzuweisen, dass die Fallzahl des 5-Jahres Follow up zum Zeitpunkt der Auswertung mit 946 Kindern noch limitiert war. Da die Nachuntersuchungen jedoch weiter durchgeführt werden, wäre eine erneute Betrachtung der Langzeitdaten der eingeschlossenen Probanden im Verlauf interessant.

In unserer Arbeit war der Polymorphismus TMPRSS6/rs855791 der größte beeinflussende Faktor der intestinalen Eisenaufnahme. Da die signifikante Assoziation zwischen einem Risikofaktor und einem Outcome nicht per se Kausalität bedeutet, wäre eine Bestätigung unserer Daten in Bezug auf die Assoziation von genetisch reduzierter intestinaler Eisenaufnahme bei Erwachsenen und der nekrotisierenden Enterokolitis bei Frühgeborenen unter 1500 g durch zusätzliche Studien ähnlicher Größe und Einschlusskriterien wünschenswert.

5. Zusammenfassung

Frühgeborene sind eine vulnerable Patientengruppe, die aufgrund ihrer Unreife ein hohes Risiko hat, kurz- und langfristige Komplikationen zu entwickeln. Das Ziel jeglicher Therapie- und Pflegemaßnahmen ist folglich die Entstehung typischer Erkrankungen des Frühgeborenen zu vermeiden und eine optimale Entwicklung der Kinder zu gewährleisten. Eisen ist Bestandteil diverser fundamentaler Stoffwechselprozesse in Zellen und Organismen und von großer Bedeutung für die physiologische Entwicklung eines Frühgeborenen. Ebenso sind nahezu alle enterischen Mikroorganismen auf eine ausreichende Verfügbarkeit von Eisen angewiesen. Die nekrotisierende Enterokolitis ist eine schwerwiegende Erkrankung, die typischerweise Frühgeborene betrifft und mit einer Todesrate von 20-30 % assoziiert ist. Aktuellen Forschungsergebnissen zufolge scheint eine intestinale Dysbiose der NEC voranzugehen und eine orale Eisentherapie die Diversität des intestinalen Mikrobioms hin zu einem pathogenerem Profil zu verschieben. Ziel unserer Untersuchung war es zu prüfen, ob eine genetisch veränderte enterale Eisenresorption (veränderter Serumeisenspiegel) Auswirkungen auf das kurz- und langfristige Outcome von Frühgeborenen unter 1500 g hat, mit besonderer Betrachtung der Entwicklung einer nekrotisierenden Enterokolitis. Das Studienkollektiv für diese Arbeit bestand aus Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g, die von 2003 bis einschließlich 2014 in das German Neonatal Network sowie in die Vorläuferstudie aufgenommen wurden. Daten zum stationären Aufenthalt und der weiteren Entwicklung der Kinder bis zum 5. Lebensjahr wurden mittels standardisierter Fragebögen erhoben. Wir isolierten die DNS von insgesamt 12.342 Kindern und genotypisierten sie im Hinblick auf das Vorkommen genetischer Varianten mit nachgewiesenem Effekt auf den Eisenstatus bei Erwachsenen (HFE/rs 1800562, HFE/rs1799945 und TMPRSS6/rs855791). Das Effekttallel jedes ausgewählten Polymorphismus steigert den Serumeisenspiegel bei Erwachsenen. Es wurden nur die Daten der 12.342 Studienteilnehmer/-innen mit erfolgreicher Genotypisierung aller 3 Polymorphismen für die weitere Auswertung verwendet. Dies gelang bei 11.166 Kindern. Wir berechneten anhand jedes einzelnen Polymorphismus die Odds Ratio für das Risiko der NEC-Operation pro SD-Einheit gesteigertem

Serumeisenspiegel mithilfe der Mendelschen Randomisierung. Je SD-Einheit erhöhten Serumeisens (und damit niedrigeren intestinalen Eisens) durch das TMPRSS6/rs855791 G-Allel reduzierte sich das Risiko einer NEC-Operation signifikant mit einer OR von 0,27 (95 % Konfidenzintervall 0,11-0,65, nominales $p = 0,004$, adjusted $p = 0,011$). Bei Betrachtung der klinischen Daten zeigte sich passend zum Ergebnis der MR ein höheres Risiko für eine NEC-OP bei Kindern mit einem rs855791 A-Allel ohne Probiotikatherapie (OR 1,12, 95 % Konfidenzintervall 1,08-1,70, $p = 0,002$). Hingegen war das Risiko für eine NEC-OP bei Trägern des rs857991 A-Allels unter einer Therapie mit Probiotika reduziert. Im Hinblick auf die weiteren Daten zum kurz- und langfristigen Outcome zeigten sich keine Unterschiede. Entsprechend unserer Ergebnisse ist anzunehmen, dass eine genetisch reduzierte Eisenresorption aus dem Darm einen möglichen Risikofaktor für die Entwicklung einer intestinalen Dysbiose und NEC bei VLBW Frühgeborenen darstellt.

Dieser Befund bedarf einer Bestätigung mittels weiterer Studien von ähnlicher Größe und Einschlusskriterien.

6. Literaturverzeichnis

- Abboud S, Haile DJ** (2000) A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 19906-19912
- Aceti A, Beghetti I, Maggio L, Martini S, Faldella G, Corvaglia L** (2018) Filling the Gaps: Current Research Directions for a Rational Use of Probiotics in Preterm Infants. *Nutrients* 10, 1472
- Adams PC, Reboussin DM, Barton JC, McLaren CE, Eckfeldt JH, McLaren GD et al.** (2005) Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. *The New England Journal of Medicine* 352, 1769-1778
- Aggett PJ** (2000) Trace elements of the micropremie. *Clinics in Perinatology* 27, 119-29
- Agostoni C, Buonocore G, Carnielli VP, de Curtis M, Darmaun D, Decsi T et al.** (2010) Enteral nutrient supply for preterm infants: commentary from the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 50, 85-91
- AlFaleh K, Anabrees J** (2014) Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Evidence-based Child Health: A Cochrane Review Journal* 9, 584-671.
- Amin SB, Myers G, Wang H** (2012) Association between neonatal iron overload and early human brain development in premature infants. *Early Human Development* 88, 583-587
- Andersson O, Hellström-Westas L, Andersson D, Domellöf M** (2011) Effect of delayed versus early umbilical cord clamping on neonatal outcomes and iron status at 4 months: a randomised controlled trial. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)* 343, 7157
- Applied Biosystems** (o.V.). http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_048139.pdf (Tag des letzten Zugriffs: 01.05.2020)
- Armitage AE, Drakesmith H** (2014) The battle for iron. *Science* 346, 1299-1300
- Armony-Sivan R, Eidelman AI, Lanir A, Sredni D, Yehuda S** (2004) Iron status and neurobehavioral development of premature infants. *Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association* 24, 757-762
- Aschemeyer S, Qiao B, Stefanova D, Valore EV, Sek AC, Ruwe TA et al.** (2018) Structure-function analysis of ferroportin defines the binding site and an alternative mechanism of action of hepcidin. *Blood* 131, 899-910
- Bailey JR, Probert CSJ, Cogan TA** (2011) Identification and characterisation of an iron-responsive candidate probiotic. *PloS One* 6, 26507

- Bardou-Jacquet** E, Ben Ali Z, Beaumont-Epinette M-P, Loreal O, Jouanolle A-M, Brissot P (2014) Non-HFE hemochromatosis: pathophysiological and diagnostic aspects. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* 38, 143-154
- Barton** JC, Edwards CQ, Acton RT (2015) HFE gene: Structure, function, mutations, and associated iron abnormalities. *Gene* 574, 179-192
- Barton** JC, Edwards CQ (2018) HFE Hemochromatosis. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al. (Hrsg.): GeneReviews®, Seattle (WA): University of Washington. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1440/> (Tag des letzten Zugriffs am 28.03.2020)
- Beard** J, de Regnier R-A, Shaw MD, Rao R, Georgieff M (2007) Diagnosis of Iron Deficiency in Infants. *Laboratory Medicine* 38, 103-108
- Benyamin** B, Ferreira MAR, Willemsen G, Gordon S, Middelberg RPS, McEvoy BP et al. (2009) Common variants in TMPRSS6 are associated with iron status and erythrocyte volume. *Nature Genetics* 41, 1173-1175
- Brissot** P, Loréal O (2016) Iron metabolism and related genetic diseases: A cleared land, keeping mysteries. *Journal of Hepatology* 64, 505-515
- Brissot** P, Pietrangelo A, Adams PC, de Graaff B, McLaren CE, Loréal O (2018) Haemochromatosis. *Nature Reviews. Disease Primers* 4, 18016
- Bührer** C (2016) Sehr kleine Frühgeborene an der Grenze der Lebensfähigkeit. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 164, 660-667
- Cherukuri** S, Potla R, Sarkar J, Nurko S, Harris ZL, Fox PL (2005) Unexpected role of ceruloplasmin in intestinal iron absorption. *Cell Metabolism* 2, 309-319
- Collard** KJ (2009) Iron homeostasis in the neonate. *Pediatrics* 123, 1208-1216
- dbSNP**, rs1800562 (o. V.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1800562> (Tag des letzten Zugriffs am 18.03.2020)
- dbSNP**, rs1799945 (o. V.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1799945> (Tag des letzten Zugriffs am 18.03.2020)
- dbSNP**, rs855791 (o. V.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs855791> (Tag des letzten Zugriffs am 18.03.2020)
- Deschemin** J-C, Noordine M-L, Remot A, Willemetz A, Afif C, Canonne-Hergaux F et al. (2016) The microbiota shifts the iron sensing of intestinal cells. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 30, 252-261
- Dewey** KG, Domellof M, Cohen RJ, Landa Rivera L, Hernell O, Lönnerdal B (2002) Iron supplementation affects growth and morbidity of breast-fed infants: results of a randomized trial in Sweden and Honduras. *The Journal of Nutrition* 132, 3249-3255
- Donovan** A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J et al. (2000) Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 403, 776-781.

- Dörpholz** G, Weigell P, Knaus P (2016) BMP-Signaltransduktion - begleitet von control freaks und gate keepers. *Biospektrum* 22, 686-690
- Drakesmith** H, Prentice AM (2012) Hepcidin and the iron-infection axis. *Science (New York, N.Y.)* 338, 768-772
- Elgin** TG, Kern SL, McElroy SJ (2016) Development of the Neonatal Intestinal Microbiome and Its Association With Necrotizing Enterocolitis. *Clinical Therapeutics* 38, 706-715
- Fleming** RE, Ponka P (2012) Iron overload in human disease. *The New England Journal of Medicine* 366, 348-359
- Franz** AR, Mihatsch WA, Sander S, Kron M, Pohlandt F (2000) Prospective randomized trial of early versus late enteral iron supplementation in infants with a birth weight of less than 1301 grams. *Pediatrics* 106, 700-706
- Franz** AR (2010) Erythropoiese. In: Gerhard J, Hübler A (Hrsg.): Neonatologie. 1. Aufl., 270-281, Thieme, Stuttgart
- Franz** AR (mündliche Korrespondenz) Effects of Transfusion Thresholds on Neurocognitive Outcome of Extremely Low Birth Weight Infants (ETTNO)- a Blinded Randomized Controlled Multicenter Trial, NCT01393496
- Galesloot** TE, Geurts-Moespot AJ, den Heijer M, Sweep FCGJ, Fleming RE, Kiemeneij LALM et al. (2013) Associations of common variants in HFE and Tmprss6 with iron parameters are independent of serum hepcidin in a general population: a replication study. *Journal of Medical Genetics* 50, 593-598
- Ganz** T (2013) Systemic iron homeostasis. *Physiological Reviews* 93, 1721-1741
- Ganz** T, Nemeth E (2015) Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Nature Reviews. Immunology* 15, 500-510
- Geissler** C, Singh M (2011) Iron, Meat and Health. *Nutrients* 3, 283-316
- Gochee** PA, Powell LW, Cullen DJ, Du Sart D, Rossi E, Olynyk JK (2002) A population-based study of the biochemical and clinical expression of the H63D hemochromatosis mutation. *Gastroenterology* 122, 646-651
- Goodnough** JB, Ramos E, Nemeth E, Ganz T (2012) Inhibition of hepcidin transcription by growth factors. *Hepatology* 56, 291-299
- Grover** S, Del Greco M F, Stein CM, Ziegler A (2017) Mendelian Randomization. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1666, 581-628
- Guo** W, Bachman E, Li M, Roy CN, Blusztajn J, Wong S et al. (2013) Testosterone administration inhibits hepcidin transcription and is associated with increased iron incorporation into red blood cells. *Aging Cell* 12, 280-291
- Hågå** P (1980) Plasma ferritin concentrations in preterm infants in cord blood and during the early anaemia of prematurity. *Acta Paediatrica Scandinavica* 69, 637-641
- Haiden** N, Pollak A (2010) Ernährung von Risikokindern. In: Gerhard J, Hübler A (Hrsg.): Neonatologie. 1. Aufl., 155-162, Thieme, Stuttgart

- Helenius** K, Sjörs G, Shah PS, Modi N, Reichman B, Morisaki N et al. (2017) Survival in Very Preterm Infants: An International Comparison of 10 National Neonatal Networks. *Pediatrics* 140, 1264
- Hentze** MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C (2010) Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 142, 24-38
- Hershko** C (2010) Pathogenesis and management of iron toxicity in thalassemia. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1202, 1-9
- Herting** E (2010) Frühgeborene. In: Gerhard J, Hübner A (Hrsg.): Neonatologie. 1. Aufl., 70-76, Thieme, Stuttgart
- Hill** C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B et al. (2014) Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 11, 506-514
- Jacob** J, Lehne M, Mischker A, Klinger N, Zickermann C, Walker J (2017) Cost effects of preterm birth: a comparison of health care costs associated with early preterm, late preterm, and full-term birth in the first 3 years after birth. *The European Journal of Health Economics: HEPAC: Health Economics in Prevention and Care* 18, 1041-1046
- Jaeggi** T, Kortman GAM, Moretti D, Chassard C, Holding P, Dostal A et al. (2015) Iron fortification adversely affects the gut microbiome, increases pathogen abundance and induces intestinal inflammation in Kenyan infants. *Gut* 64, 731-742
- Joy** R, Krishnamurthy S, Bethou A, Rajappa M, Ananthanarayanan PH, Bhat BV (2014) Early versus late enteral prophylactic iron supplementation in preterm very low birth weight infants: a randomised controlled trial. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition* 99, F105-9
- Karwowski** MP, Just AC, Bellinger DC, Jim R, Hatley EL, Ettinger AS et al. (2014) Maternal iron metabolism gene variants modify umbilical cord blood lead levels by gene-environment interaction: a birth cohort study. *Environmental Health: A Global Access Science Source* 13, 77
- Knutson** MD, Oukka M, Koss LM, Aydemir F, Wessling-Resnick M (2005) Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 1324-1328
- Libuda** L, Laabs B-H, Ludwig C, Bühlmeier J, Antel J, Hinney A et al. (2019) Vitamin D and the Risk of Depression: A Causal Relationship? Findings from a Mendelian Randomization Study. *Nutrients* 1, 1085
- Lönnerdal** B (2014) Infant formula and infant nutrition: bioactive proteins of human milk and implications for composition of infant formulas. *The American Journal of Clinical Nutrition* 99, 712S-7S
- Lönnerdal** B (2016) Bioactive Proteins in Human Milk: Health, Nutrition, and Implications for Infant Formulas. *The Journal of Pediatrics* 173, 4-9.

- Lönnerdal B**, Georgieff MK, Hernell O (2015) Developmental Physiology of Iron Absorption, Homeostasis, and Metabolism in the Healthy Term Infant. *The Journal of Pediatrics* 167, 8-14
- Lozoff B**, Georgieff MK (2006) Iron deficiency and brain development. *Seminars in Pediatric Neurology* 13, 158-165
- McKie AT**, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D et al. (2000) A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Molecular Cell* 5, 299-309
- Moonen RM**, Huizing MJ, González-Luis GE, Cavallaro G, Mosca F, Villamor E (2020) Risk of Necrotizing Enterocolitis Associated With the Single Nucleotide Polymorphisms VEGF C-2578A, IL-18 C-607A, and IL-4 Receptor α -Chain A-1902G: A Validation Study in a Prospective Multicenter Cohort. *Frontiers in Pediatrics* 8, 45
- Muckenthaler MU**, Rivella S, Hentze MW, Galy B (2017) A Red Carpet for Iron Metabolism. *Cell* 168, 344-361
- Nai A**, Pagani A, Silvestri L, Campostrini N, Corbella M, Girelli D et al. (2011) TMPRSS6 rs855791 modulates hepcidin transcription in vitro and serum hepcidin levels in normal individuals. *Blood* 118, 4459-4462
- Nemeth E**, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward McVey D et al. (2004) Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science (New York, N.Y.)* 306, 2090-2093
- Neu J**, Walker WA (2011) Necrotizing enterocolitis. *The New England Journal of Medicine* 364, 255-264
- Paganini D**, Uyoga MA, Kortman GAM, Cercamondi CI, Moretti D, Barth-Jaeggi T et al. (2017) Prebiotic galacto-oligosaccharides mitigate the adverse effects of iron fortification on the gut microbiome: a randomised controlled study in Kenyan infants. *Gut* 66, 1956-1967
- Paganini D**, Zimmermann MB (2017) The effects of iron fortification and supplementation on the gut microbiome and diarrhea in infants and children: a review. *The American Journal of Clinical Nutrition* 106, 1688S-1693S
- Pammi M**, Cope J, Tarr PI, Warner BB, Morrow AL, Mai V et al. (2017) Intestinal dysbiosis in preterm infants preceding necrotizing enterocolitis: a systematic review and meta-analysis. *Microbiome* 5, 31
- Pammi M**, Suresh G (2017) Enteral lactoferrin supplementation for prevention of sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 6, CD007137
- Papile LA**, Burstein J, Burstein R, Koffler H (1978) Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm. *The Journal of Pediatrics* 92, 529-534
- Park CH**, Valore EV, Waring AJ, Ganz T (2001) Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 7806-7810

- Patel RM**, Knezevic A, Shenvi N, Hinkes M, Keene S, Roback JD et al. (2016) Association of Red Blood Cell Transfusion, Anemia, and Necrotizing Enterocolitis in Very Low-Birth-Weight Infants. *Journal of the American Medical Association* 315, 889-897
- Pichler I**, Del Greco M F, Gögele M, Lill CM, Bertram L, Do CB et al. (2013) Serum iron levels and the risk of Parkinson disease: a Mendelian randomization study. *PLoS Medicine* 10, 1001462
- Pietrangelo AFF** (2004) Hereditary hemochromatosis – A New Look at an Old Disease. *The New England Journal of Medicine* 350, 2383-2397
- Pietrangelo A** (2010) Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology* 139, 393-408
- Rao R**, Georgieff MK (2007) Iron in fetal and neonatal nutrition. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 12, 54-63
- Rao R**, Georgieff MK (2009) Iron therapy for preterm infants. *Clinics in Perinatology* 36, 27-42
- Sangkhae V**, Nemeth E (2017) Regulation of the Iron Homeostatic Hormone Hepcidin. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)* 8, 126-136
- Sazawal S**, Black RE, Ramsan M, Chwaya HM, Stoltzfus RJ, Dutta A et al. (2006) Effects of routine prophylactic supplementation with iron and folic acid on admission to hospital and mortality in preschool children in a high malaria transmission setting: community-based, randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet* 367, 133-143
- Schnabl KL**, van Aerde JE, Thomson AB, Clandinin MT (2008) Necrotizing enterocolitis: a multifactorial disease with no cure. *World Journal of Gastroenterology* 14, 2142-2161
- Segeer H** (2010) Nekrotisierende Enterokolitis. In: Gerhard J, Hübner A (Hrsg.): Neonatologie. 1. Aufl., 343-347, Thieme, Stuttgart
- Shawki A**, Knight PB, Maliken BD, Niespodzany EJ, Mackenzie B (2012) H(+)-coupled divalent metal-ion transporter-1: functional properties, physiological roles and therapeutics. *Current Topics in Membranes* 70, 169-214
- Soofi S**, Cousens S, Iqbal SP, Akhund T, Khan J, Ahmed I et al. (2013) Effect of provision of daily zinc and iron with several micronutrients on growth and morbidity among young children in Pakistan: a cluster-randomised trial. *The Lancet* 382, 29-40
- Sørensen E**, Rigas AS, Thørner LW, Burgdorf KS, Pedersen OB, Petersen MS et al. (2016) Genetic factors influencing ferritin levels in 14,126 blood donors: results from the Danish Blood Donor Study. *Transfusion* 56, 622-627
- Spiegler J**, Preuß M, Gebauer C, Bendiks M, Herting E, Göpel W (2016) Does Breastmilk Influence the Development of Bronchopulmonary Dysplasia?. *The Journal of Pediatrics* 169, 76-80
- Stainsby D**, Jones H, Wells AW, Gibson B, Cohen H (2008) Adverse outcomes of blood transfusion in children: analysis of UK reports to the serious hazards of transfusion scheme 1996-2005. *British Journal of Haematology* 141, 73-79

- Stichtenoth** G, Demmert M, Bohnhorst B, Stein A, Ehlers S, Heitmann F et al. (2012) Major contributors to hospital mortality in very-low-birth-weight infants: data of the birth year 2010 cohort of the German Neonatal Network. *Klinische Padiatrie* 224, 276-281
- Stoll** BJ, Hansen NI, Bell EF, Walsh MC, Carlo WA, Shankaran S et al. (2015) Trends in Care Practices, Morbidity, and Mortality of Extremely Preterm Neonates, 1993-2012. *Journal of the American Medical Association* 314, 1039-1051
- Sullivan** S, Schanler RJ, Kim JH, Patel AL, Trawöger R, Kiechl-Kohlendorfer U et al. (2010) An exclusively human milk-based diet is associated with a lower rate of necrotizing enterocolitis than a diet of human milk and bovine milk-based products. *The Journal of Pediatrics* 156, 562-567
- Sun** J, Hu XL, Le GW, Shi YH (2010) Lactobacilli prevent hydroxy radical production and inhibit Escherichia coli and Enterococcus growth in system mimicking colon fermentation. *Letters in Applied Microbiology* 50, 264-269
- Talavera** MM, Jin Y, Zmuda EJ, Frick J, McBride KL, Nelin LD, Trittman JK (2020) Single nucleotide polymorphisms in the dual specificity phosphatase genes and risk of necrotizing enterocolitis in premature infant. *Journal of Neonatal-Perinatal Medicine*
- Taylor** TA, Kennedy KA (2013) Randomized trial of iron supplementation versus routine iron intake in VLBW infants. *Pediatrics* 131, 433-438
- Thomas** JP, Raine T, Reddy S, Belteki G (2017) Probiotics for the prevention of necrotising enterocolitis in very low-birth-weight infants: a meta-analysis and systematic review. *Acta Paediatrica* 106, 1729-1741
- Traglia** M, Girelli D, Biino G, Campostrini N, Corbella M, Sala C et al. (2011) Association of HFE and TMPRSS6 genetic variants with iron and erythrocyte parameters is only in part dependent on serum hepcidin concentrations. *Journal of Medical Genetics* 48, 629-634
- Van der Harst** P, Zhang W, Mateo Leach I, Rendon A, Verweij N, Sehmi J et al. (2012) Seventy-five genetic loci influencing the human red blood cell. *Nature* 492, 369-375
- Vashchenko** G, MacGillivray RTA (2013) Multi-copper oxidases and human iron metabolism. *Nutrients* 5, 2289-2313
- Voigt** M, Rochow N, Guthmann F, Hesse V, Schneider KTM, Schnabel D (2012) Geburtsgewichtssperzentilwerte für Mädchen und Knaben unter Berücksichtigung der Körperhöhe der Mutter. *Zeitschrift für Geburtshilfe und Neonatologie* 216, 212-219
- Wallace** DF, Subramaniam VN (2016) The global prevalence of HFE and non-HFE hemochromatosis estimated from analysis of next-generation sequencing data. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 18, 618-626
- Wang** C-Y, Babitt JL (2019) Liver iron sensing and body iron homeostasis. *Blood* 133, 18-29

- Ward** McVey D, Kaplan J (2012) Ferroportin-mediated iron transport: expression and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1823, 1426-1433
- Warner** BB, Deych E, Zhou Y, Hall-Moore C, Weinstock GM, Sodergren E et al. (2016) Gut bacteria dysbiosis and necrotising enterocolitis in very low birthweight infants: a prospective case-control study. *The Lancet* 387, 1928-1936
- Wolke** D, Jaekel J (2016) Langzeitüberlebensqualität ehemaliger kleiner Frühgeborener. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 164, 673-684
- Zimmermann** MB, Chassard C, Rohner F, N'goran EK, Nindjin C, Dostal A et al. (2010) The effects of iron fortification on the gut microbiota in African children: a randomized controlled trial in Cote d'Ivoire. *The American Journal of Clinical Nutrition* 92, 1406-1415
- Zlotkin** S, Newton S, Aimone AM, Azindow I, Amenga-Etego S, Tchum K, et al. (2013) Effect of iron fortification on malaria incidence in infants and young children in Ghana: a randomized trial. *Journal of the American Medical Association* 310, 938-947

7. Anhänge

7.1. Anhang 1: CaseReportForms

Stand: 01.01.2017

		Name Kind: <input type="text"/>	
		Name Mutter: <input type="text"/>	
Straße; Nr.: <input type="text"/>			
PLZ; Wohnort: <input type="text"/>			
Einschluss 1 / 3		Geb. Kind: <input type="text"/>	
		PE Labor: <input type="text"/>	EV?: <input type="checkbox"/> Klinik: HL <input type="checkbox"/> 1

<p>1. Einschluss ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/></p> <p>Nabelschnurrest eingefroren? <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Einschluss nur bei Übernahme am 1. LT!</p> <p>Outborn? <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> →</p> <p>2. Geschlecht: weiblich <input type="checkbox"/> männlich <input type="checkbox"/></p> <p>3. Mehrling nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/></p> <p>Nr. des Mehrlings: <input type="text"/> von <input type="text"/> Mehrlingen</p> <p>Fetofetales Transfusionsynd. nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> ja, mit Laser <input type="checkbox"/></p> <p>4. Informationen zur Geburt nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/></p> <p>Blasensprung vor Wehen? <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> ↓</p> <p>falls "ja": Datum: <input type="text"/> Uhrzeit: <input type="text"/> : <input type="text"/></p> <p>Geburtsmodus:</p> <p>Spontangeburt <input type="checkbox"/> Sectio <input type="checkbox"/> Notsectio <input type="checkbox"/></p> <p>APGAR 5 Minuten <input type="text"/></p> <p>APGAR 10 Minuten <input type="text"/></p> <p>Nabelarterien-ph: <input type="text"/></p> <p>Nabelarterien BE (+/-): <input type="text"/></p> <p>5. Geburtsdaten / Gestationsalter (GA)</p> <p>GG: <input type="text"/> g Körpertemp.: <input type="text"/> °C</p> <p>KL: <input type="text"/> cm GA: <input type="text"/> + <input type="text"/></p> <p>KU: <input type="text"/> cm</p> <p>6. Erstversorgung - Uhrz. Geb.: <input type="text"/> : <input type="text"/></p> <p>Versorgung in den ersten 60 Minuten:</p> <p>Sustained Inflation <input type="checkbox"/> Pufferung <input type="checkbox"/></p> <p>LISA <input type="checkbox"/> Volumensubstitut. (10 ml/kg KG) <input type="checkbox"/></p> <p>Surfactant über Tubus <input type="checkbox"/> Adrenalin <input type="checkbox"/></p> <p>Intubation <input type="checkbox"/> Herzdruckmassage <input type="checkbox"/></p> <p style="text-align: center;">Keine d. Maßnahmen <input type="checkbox"/></p> <p>7. CRIB-Score (erste 12h)</p> <p>Niedrigster BE (+/-) <input type="text"/> min. O2: <input type="text"/> max. O2: <input type="text"/></p> <p><input type="text"/> mmol/l <input type="text"/> % <input type="text"/> %</p> <p>→ Wenn "N.-BE" > 0, dann eine "98" dokumentieren.</p> <p>8. Schwere Fehlbildungen oder Chromosomopathien</p> <p style="text-align: right;">nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/></p> <p>9. Niedrigster MAD (innerhalb der ersten 24 h)</p> <p>Manschette <input type="checkbox"/> Arterie <input type="checkbox"/> <input type="text"/> mmHg</p> <p>10. Katecholamine in d. ersten 24h? nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/></p>	<p>11. Lungenreifebeh. v. Geburt nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/></p> <p>Betamethason <input type="checkbox"/></p> <p>Dexamethason <input type="checkbox"/></p> <p>Vollständiger Zyklus (2 Dosen + 12h nach 2. Dosis) nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/></p> <p>12. Tokolysebehandlung v. Geburt nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/></p> <p>Magnesium intravenös <input type="checkbox"/> Nifedipin (Adalat®) <input type="checkbox"/></p> <p>Fenoterol (Partusisten®) <input type="checkbox"/> Sonstiges: <input type="text"/></p> <p>Atosiban (Tractotile®) <input type="checkbox"/></p> <p>Tokolyse seit (Datum): <input type="text"/></p> <p>13. Weitere Maßnahmen? nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/></p> <p>Cerclage <input type="checkbox"/> in SSW: <input type="text"/></p> <p>Pessar <input type="checkbox"/> in SSW: <input type="text"/></p> <p>Progesteron <input type="checkbox"/> seit SSW: <input type="text"/></p> <p>stationärer Aufenthalt der Mutter > 1 Woche <input type="checkbox"/> SSW: <input type="text"/></p> <p>14. Antenat. Antibiotische Therapie nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/></p> <p>Cephalosporine <input type="checkbox"/></p> <p>Metronidazol (Clont®) <input type="checkbox"/></p> <p>Ampicillin und andere Penicilline <input type="checkbox"/></p> <p>Imipenem/Meropenem <input type="checkbox"/></p> <p>15. Ursache der zu frühen Geburt</p> <p>unhemmbare Wehen <input type="checkbox"/> patholog. CTG <input type="checkbox"/></p> <p>V.a. Amnioninfektion <input type="checkbox"/> Wachstumsretard./patholog. Doppler <input type="checkbox"/></p> <p>EPH-Gestose <input type="checkbox"/> Placentalösung <input type="checkbox"/></p> <p>HELLP <input type="checkbox"/> Anhydramnie / BS > 5 Tage <input type="checkbox"/></p> <p style="text-align: right;">Fruchtblasenprolaps <input type="checkbox"/></p> <p>16. Alter und Herkunft der Mutter Alter: <input type="text"/> Jahre <input type="text"/></p> <p>Deutschland <input type="checkbox"/> Asien <input type="checkbox"/></p> <p>übriges Europa <input type="checkbox"/> Afrika <input type="checkbox"/></p> <p>einschl. Russland <input type="checkbox"/> Naher Osten, einschl. Türkei u. Nordafrika <input type="checkbox"/></p> <p>17. Schulabschluss der Mutter</p> <p>Hochschulreife <input type="checkbox"/> Realschule <input type="checkbox"/> Sonstiges/ Kein Abschluss <input type="checkbox"/></p> <p>18. Vorausgegangene Geburten? nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/></p> <p>Wenn ja: keine römischen Zahlen</p> <p>Gravida: (ohne diese Geburt) <input type="text"/></p> <p>Para: (ohne diese Geburt) <input type="text"/></p> <p>Frühgeburten vor 37 + 0 SSW?: nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/></p> <p>(ohne diese Geburt)</p> <p style="border: 1px dashed black; padding: 5px; margin-top: 10px;">Hiermit bestätige ich die Richtigkeit der Angaben:</p> <p style="border: 1px dashed black; padding: 5px; margin-top: 5px;">Name / Unterschrift (dokum. Arzt/ Ärztin)</p>
---	--

Wenn keine Angaben vorhanden, bitte das Zeichen ("0" oder "7") neben das Textfeld setzen !!!

Von Lübeck auszufüllen: **FB1V7** Eingabe Monitor korr. Eingabe

Datenbogen des Kindes bitte ausfüllen und zusammen mit je zwei Mundschleimhautabstrichen von Mutter und Kind an die Studienzentrale senden.

Stand: 01.01.2017

Behandlung 2 / 3		Name Kind: _____	
Geburtstag: _____		Klinik: HL	Nr.: 1

1. Prophylaktische Medikamente		nein	<input type="checkbox"/>	ja	<input type="checkbox"/>
Vitamin K:	nein <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> → oral <input type="checkbox"/> i.m. <input type="checkbox"/> i.v. <input type="checkbox"/> s.c. <input type="checkbox"/>				
Teicoplanin/Vanco zur Sepsis-Prophylaxe	<input type="checkbox"/>	Vorgegebene Auswahl nicht streichen! → Textfeld verwenden		<input type="checkbox"/>	
Fluconazol zur Pilzsepsis-Prophylaxe	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	
Indomethacin zur Prophylaxe der IVH	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	
Erythropoietin zur Anämie-Prophylaxe	<input type="checkbox"/>			<input type="checkbox"/>	

2. Antibiotische Therapie		nein	<input type="checkbox"/>	ja	<input type="checkbox"/>
Amikacin <input type="checkbox"/>	Clarithromycin <input type="checkbox"/>	Meropenem <input type="checkbox"/>			
AmphotericinB <input type="checkbox"/>	Erythromycin <input type="checkbox"/>	Metronidazol (Clontar) <input type="checkbox"/>			
Ampi/Amoxicillin <input type="checkbox"/>	Flocloracill. <input type="checkbox"/>	Mezlocillin <input type="checkbox"/>			
Ampi/Sulbactam <input type="checkbox"/>	Fluconazol <input type="checkbox"/>	Piperacillin <input type="checkbox"/>			
Cefazolin <input type="checkbox"/>	Fosfomycin <input type="checkbox"/>	Tazobactam <input type="checkbox"/>			
Cefotaxim <input type="checkbox"/>	Gentamicin <input type="checkbox"/>	Teicoplanin <input type="checkbox"/>			
Ceftazidim <input type="checkbox"/>	Imipenem (Zienhamis) <input type="checkbox"/>	Tobramycin <input type="checkbox"/>			
Cefuroxim <input type="checkbox"/>	Linezolid <input type="checkbox"/>	Vancomycin <input type="checkbox"/>			

3. Katecholamin-Therapie		nein	<input type="checkbox"/>	ja	<input type="checkbox"/>
Dopamin <input type="checkbox"/>	Dobutamin <input type="checkbox"/>				
Noradrenalin <input type="checkbox"/>	Adrenalin <input type="checkbox"/>				

4. Analgetika u. Sedativa		nein	<input type="checkbox"/>	ja	<input type="checkbox"/>
Paracetamol <input type="checkbox"/>	Midazolam <input type="checkbox"/>	Piritramid <input type="checkbox"/>			
Morphin <input type="checkbox"/>	Fentanyl <input type="checkbox"/>	Sulfentanil <input type="checkbox"/>			
Thiopental <input type="checkbox"/>	Propofol <input type="checkbox"/>	Propofol <input type="checkbox"/>			
Pentobarbital <input type="checkbox"/>	Chloralhydrat <input type="checkbox"/>	Diazepam <input type="checkbox"/>			
Andere <input type="checkbox"/>					

5. Surfactantgabe		nein	<input type="checkbox"/>	ja	<input type="checkbox"/>
Wenn ja, bitte Anzahl und Darreichungsform angeben: _____ X					
mit Sonde / Spontanatmung _____					
mit Tubus _____					

6. Diuretika		nein	<input type="checkbox"/>	ja	<input type="checkbox"/>
Furosemid (Lasix) <input type="checkbox"/>					
Hydrochlorothiazid <input type="checkbox"/>					
Spironolacton (Aldactone) <input type="checkbox"/>					

7. Inhalative Medikamente		nein	<input type="checkbox"/>	ja	<input type="checkbox"/>
Salbutamol <input type="checkbox"/>	Budesonid <input type="checkbox"/>	Atrovent <input type="checkbox"/>			
Furosemid <input type="checkbox"/>	Sultanol <input type="checkbox"/>	Flutide <input type="checkbox"/>			
NO <input type="checkbox"/>	Pulmicort <input type="checkbox"/>				

8. Transfusionen "bitte komplett ausfüllen"		nein	<input type="checkbox"/>	ja	<input type="checkbox"/>
Blut (EK):	Keine <input type="checkbox"/> 1x <input type="checkbox"/> 2x <input type="checkbox"/> 3x <input type="checkbox"/>	Anzahl bei > 3 x: _____ X			
FFP:	→ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	_____ X			
TK:	→ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	_____ X			

Wenn "ja", dann auch "Keine" angeb., da freie Felder als "keine Angabe" geführt werden.

9. Atemanalept. Medikamente		nein	<input type="checkbox"/>	ja	<input type="checkbox"/>
Coffein <input type="checkbox"/>	Theophyllin <input type="checkbox"/>	Doxapram <input type="checkbox"/>			

10. Sonstige Medikamente		nein	<input type="checkbox"/>	ja	<input type="checkbox"/>
Acetylcystein <input type="checkbox"/>	Hydrocortison <input type="checkbox"/>	Omeprazol <input type="checkbox"/>			
Ambroxol (Mucosulvan) <input type="checkbox"/>	Ibuprofen <input type="checkbox"/>	Phosphat <input type="checkbox"/>			
Ca-Gluconat <input type="checkbox"/>	Indomethacin <input type="checkbox"/>	Prednisolon <input type="checkbox"/>			
Ca-Glycerolph. <input type="checkbox"/>	Insulin <input type="checkbox"/>	Ranitidin <input type="checkbox"/>			
Calcium <input type="checkbox"/>	L_Thyroxin <input type="checkbox"/>	Sildenafil <input type="checkbox"/>			
Ca-Phosph. <input type="checkbox"/>	Na-Gluconat <input type="checkbox"/>	Ursodesoxych.-Säure (Ursotalkin) <input type="checkbox"/>			
Dexamethason <input type="checkbox"/>	Na-Glyceroph. <input type="checkbox"/>	Vitamine-nicht D <input type="checkbox"/>			
Eisen <input type="checkbox"/>	Na-bicarbonat <input type="checkbox"/>	Zink <input type="checkbox"/>			
Glucose <input type="checkbox"/>	NaCl <input type="checkbox"/>	Kalium/KCl <input type="checkbox"/>			

11. Probiotika		nein	<input type="checkbox"/>	ja	<input type="checkbox"/>
Lactobacillus + Bifidobacterium (z.B. Inflanor®) <input type="checkbox"/>					
Lactobacillus GG (z.B. Infectopharm LGG®) <input type="checkbox"/>					
E-coli (z.B. Mutaflor®) <input type="checkbox"/>					

12. Impfungen (stationär)		nein	<input type="checkbox"/>	ja	<input type="checkbox"/>
6-fach-Impfstoff (TDP; HiB, IPV, HB) <input type="checkbox"/>					
Pneumokokken-Konjugat <input type="checkbox"/>					
RSV passiv (Palivizumab) <input type="checkbox"/>					
Rotaviren: → Rotarix <input type="checkbox"/>					
→ RotaTeq <input type="checkbox"/>					

13. Medik. Wg. NW abgesetzt?		nein	<input type="checkbox"/>	ja	<input type="checkbox"/>
wg. _____					

14. Zentr.-venöse Katheter		nein	<input type="checkbox"/>	ja	<input type="checkbox"/>
Katheterart: ZVK <input type="checkbox"/>	NVK <input type="checkbox"/>	Silastik <input type="checkbox"/>			
<input type="checkbox"/> Komplikationen?: _____					

15. Arterielle Katheter		nein	<input type="checkbox"/>	ja	<input type="checkbox"/>
Nabel-Arterienkatheter <input type="checkbox"/>					
periphere Arterienkatheter <input type="checkbox"/>					
⇒ Extremitätennekrosen? <input type="checkbox"/>	nein	<input type="checkbox"/>	ja	<input type="checkbox"/>	

16. Nahrungsaufbau					
Beginn Nahrungsaufbau am _____	Lebenstaa				
Erstmals vollständig oral (150 ml/kg) _____	Lebenstaa				
Anzahl der Tage mit iv-Zugang _____	Tage				

Nahrung		bei Entlassung		während des Aufenth.	
Muttermilch <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Vorgegebene Auswahl nicht streichen! <input type="checkbox"/>	Verwenden Sie zur Angabe v. z.B. "Neocate" das Textfeld "andere Nahrung" unten. <input type="checkbox"/>		
Spenderinnenmilch <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
FG-Nahrung (z.B. HuO) <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
Pre-Nahrung <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				

Nahrungszusätze:		<input type="checkbox"/> ↓	<input type="checkbox"/> ↓
Zusätze auf Station:			
Zusätze bei Entlassung:			
andere Nahrung (Entl. St.) _____			

→ Felder frei lassen, wenn keine Zusätze!

Von Lübeck auszufüllen:	FB2V7	Eingabe	Monitor	korrr. Eingabe
-------------------------	--------------	---------	---------	----------------

Bitte nicht über die Bezeichnung FB2V6 stempeln!

Hiermit bestätige ich die Richtigkeit der Angaben:

Name / Unterschrift (dokum. Arzt / Ärztin)

Stand: 01.01.2017

	Verlauf 3 / 3	Name Kind:
	Geburtsstempel: 	Klinik: HL Nr.: 1

1. Sauerstoffzufuhr nein ☐ ja ☐

Beginn : . .

Endg. Beendigung: . .

Wenn das Kind mit O2-Bedarf entlassen wurde, dann entspricht "Endg. Beendigung" dem Entlassungsdatum.

Sauerstoffbedarf bei Entlassung? nein ☐ ja ☐
2. Atemhilfe nein ☐ ja ☐
CPAP ☐CPAP mit Beatmungshüben (nasal/pharyngeal) ☐HFO - CPAP ☐Highflow ☐

Endg. Beendigung dieser Atemhilfen bitte unten bei Punkt 4 angeben.

3. Beatmungsmodus nein ☐ ja ☐
Konventionelle Beatmung (IMV; SIMV; etc.) ☐Hochfrequenzoszillation (HFO) ☐
4. Tracheale Beatmungszeiten (+ Beatmung bei OP) nein ☐ ja ☐

1. Beatmg. vom . . bis . .

2. Beatmg. vom . . bis . .

3. Beatmg. vom . . bis . .

4. Beatmg. vom . . bis . .

5. Beatmg. vom . . bis . .

6. Beatmg. vom . . bis . .

7. Beatmg. vom . . bis . .

Endg. Beendigung jegl. Langzeit-Atemhilfe (CPAP / tr. Beatmung / u. a.) . .

Beatmung bei Entlassung? nein ☐ ja ☐
5. Pneumothorax / PIE nein ☐ ja ☐
Pneumothorax mit Drainage nein ☐ ja ☐
- unter trachealer Beatmung ☐
- unter CPAP ☐
- Spontanatmung ☐
6. Sepsis/SIRS (Kriterien NEO-KISS) nein ☐ ja ☐

 Beginn innerhalb 72h ? ☐

 Erreger in Blutkultur? ☐

 Erreger-Nr.: Datum Erregernachweis:

 1. Sepsis: →

 2. Sepsis: →

 3. Sepsis: →

 Andere Sepsiserreger: →
Erregerkatalog:

kein Keimnachweis 00 00

Enterokokken ENT 34

Enterobacter ENB 39

Pseudomonas aeruginosa PAE 42

Staphyl. epidermidis KNS 32

Staphyl. aureus SAU 31

Staphyl. Aureus Oxacillin resist. MRSA 51

E. coli ESBL bildend ESBL_ECO 50

Klebsiella ESBL bildend ESBL_KLE 53

E. feacium/ E. feacalis Vancomycin resist. VRE 52

Serratia SER 40

Listeria monocytogenese LMO 43

Candida CAN 46

Streptokok Gruppe B BST 33

Datenbogen des Kindes bitte ausfüllen und zusammen mit dem Bogen 2 (gelb) nach Entlassung/Verlegung ohne wieder Aufnahme des Kindes an die Studienzentrale senden.:

Klinik für Kinder und Jugendmedizin, Prof. Dr. W. Göpel, 23538 Lübeck

7. Pneumonie / NEC (Kriterien NEO-KISS)

 Pneumonie: nein ☐ ja ☐

 NEC II / III (auch ohne OP): vor 72 h ☐ nach 72h ☐
8. Schädelsonogramm nein ☐ ja ☐

 Grad: I ☐ II ☐ III ☐ IV ☐

 IVH ☐

 PVL ☐
9. Hüftsono nein ☐ ja ☐

 Hüftgelenksdyspl. >= 2 nach Graf nein ☐ ja ☐
10. Ophthalmol. Untersuchung nein ☐ ja ☐

 max. ROP-Stadium: → Ziffern 0 bis 5 ; 0 entspricht 0

 Datum: links ☐ rechts ☐ bds. ☐

 Bevacizumab ☐

 Laser ☐

 Kryo ☐
11. Apparatives Hörscreening nein ☐ ja ☐

 unauffällig → ☐ auffällig → ☐
12. Operationen nein ☐ ja ☐

 PDA-OP ☐

 NEC-OP ☐

 FIP-OP ☐

 VP-Shunt ☐

 Herniotomie ☐

 Sonst. OPs? ☐
Art der OP (Freitext in Druckbuchstaben):
13. BPD (nach Walsh, 35+0 bis 36+6 SSW) nein ☐ ja ☐

 O2-Bedarf < 30% (moderat) ☐

 O2-Bedarf > 30%, CPAP od. Beatmung (schwer) ☐
14. Entlassung/Verlegung (ohne Wiederaufnahme!)
!!! Datum Entlassung: . .

 Gewicht: Gramm

 KU: cm

 nach Hause ☐

 Verlegt ☐ → Grund:

 Tod in Klinik ☐ → Grund:

 Von Lübeck auszufüllen: **FB3V7**

 Eingabe Monitor korr. Eingabe

Hiermit bestätige ich die Richtigkeit der Angaben:

Name / Unterschrift (dokum. Arzt / Ärztin)

7.2. Anhang 2: Protokoll zur DNS-Isolierung aus Mundschleimhautabstrichen mit dem QIAamp® 96 DNA Kit

1. Tupfer in Eppendorf-Reaktionsgefäße (Eppis) brechen
2. + 400 µl PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung) in alle Eppis
3. + 400 µl AL-Puffer in alle Eppis
4. + 20 µl Protease → sofort 15 Sekunden vortexen
5. 1 Stunde bei 56 °C im Thermoschüttler inkubieren, Speed 500
6. + 400 µl Ethanol in alle Eppis → vortexen
7. 96er-Säulen auf den S-Block setzen → vortexen
8. 2x600 µl Probe in die 96 Wells geben (Tupfer ausdrücken) → mit Folie verschließen
9. Austarieren der Zentrifuge: 1050 µl Wasser auf 96er-Säulen mit S-Block geben und mit der Folie verschließen 4 Minuten bei 6000 rpm zentrifugieren
10. Flüssigkeit aus den S-Blöcken ausschütten, Block auf Papier ausklopfen und unter die Säulen stellen
11. + 500 µl Waschpuffer 1 → mit Folie verschließen
12. Austarieren der Zentrifuge: + 500 µl Wasser → mit Folie verschließen
13. 2 Minuten bei 6000 rpm zentrifugieren
14. Blöcke nicht leeren
15. + 500 µl Waschpuffer 2 → mit Folie verschließen
16. Austarieren der Zentrifuge: + 500 µl Wasser → mit Folie verschließen
17. 15 Minuten bei 6000 rpm zentrifugieren
18. 96er-Säulen auf die blaue 96er-Platte setzen (Elution Microtubes CL)
19. + 200 µl AE-Puffer → mit Folie verschließen
20. Austarieren der Zentrifuge: + 200 µl Wasser → mit Folie verschließen
21. 4 Minuten bei 6000 rpm zentrifugieren
22. + 200 µl AE-Puffer → mit Folie verschließen
23. Austarieren der Zentrifuge: + 200 µl Wasser → mit Folie verschließen
24. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
25. 4 Minuten bei 6000 rpm zentrifugieren
26. Säulen verwerfen, AE-Puffer aus der Negativ-Kontrolle pipettieren
27. Proben aus der blauen 96er-Platte in eine Deep-Well-Platte pipettieren (450 µl)
28. Deep-Well-Platte mit Folie verschließen, beschriften und bei -20 °C lagern

Zentrifuge: Sigma 4-16

7.3. Anhang 3: Protokoll zur DNS-Isolierung aus Nabelschnüren mit dem Gentra® Puregene® Tissue Kit

1. Nabelschnur etwa 100 mg klein schneiden
+ 3 ml Cell Lysis Solution
+ 30 µl Puregene Proteinase K → vortexen
über Nacht bei 55 °C im Thermoschüttler inkubieren, Speed 600
2. + 15 µl RNase A Solution → vortexen
für 1 Stunde bei 37 °C im Thermoschüttler inkubieren, Speed 600
3. Für 3 Minuten im Eis runterkühlen
4. + 1 ml Protein Precipitation Solution → sofort 20 Sekunden hochtourig vortexen
5. 10 Minuten bei 5000 rpm zentrifugieren → Proteine befinden sich jetzt in Form eines festen Pellets am Boden des Röhrchens
6. DNS-Überstand in ein neues Röhrchen mit 1 ml Protein Precipitation Solution überführen und die Proteinfällung wiederholen → auf Eis pipettieren
7. 3 ml Isopropanol 100 % in ein neues Röhrchen pipettieren
8. Den DNS-Überstand dazugeben und das Röhrchen vorsichtig über Kopf schwenken
9. 5 Minuten bei 5000 rpm zentrifugieren → DNS befindet sich jetzt als Pellet am Boden des Röhrchens
10. Überstand vorsichtig abgießen und das Röhrchen kopfüber auf sauberes Papier abtropfen lassen → auf Pellet achten
11. + 3 ml Ethanol 70 % → Probe vorsichtig durchspülen, um das DNS-Pellet zu waschen
12. 5 Minuten bei 5000 rpm zentrifugieren
13. Alkohol vorsichtig abgießen, Röhrchen über Kopf auf Papier abtropfen lassen
14. Ethanolwaschschritt wiederholen
15. Röhrchen über Kopf auf sauberem Papier für etwa 2 Stunden lufttrocknen lassen
16. + 150 µl DNS Hydration Solution → vorsichtig mit Pipette durchspülen
17. Über Nacht bei 25 °C im Thermoschüttler inkubieren, Speed 300 oder bei Raumtemperatur länger stehen lassen, hin und wieder bewegen, da die langen DNS-Stränge sonst zerbrechen
18. DNS-Konzentrationsmessung: Einstellung auf 50-70 ng/µl

Zentrifuge: Heraeus Megafuge 2.0

7.4. Anhang 4: Genotypisierungsanalyse mittels TaqMan®-PCR

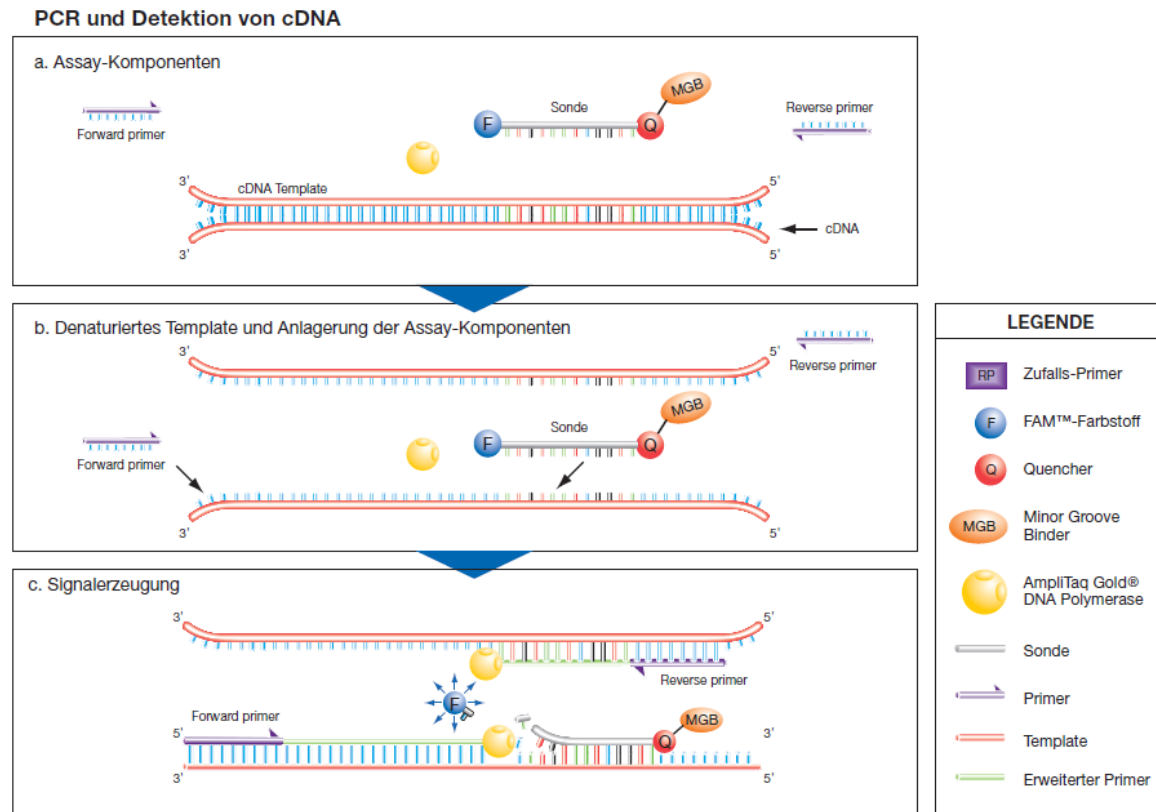


Abbildung 4: Die Abbildung 4 zeigt die Funktionsweise von Genotypisierungsanalysen mit dem StepOne™ Real-Time PCR System von Applied Biosystems. Bindet die mit einem fluoreszierenden Farbstoff markierte Sonde während der PCR an die entsprechende Komplementärsequenz zwischen Forward- und Reverse-Primer, so wird sie durch eine Taq-DNS-Polymerase gespalten. Daraufhin entfernt sich der Reporter-Farbstoff vom Quencher, das Fluoreszenzsignal verstärkt sich und kann gemessen werden.

(Quelle: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_048139.pdf)

7.5. Anhang 5: Allelische Diskriminierung mittels Cluster-Plot

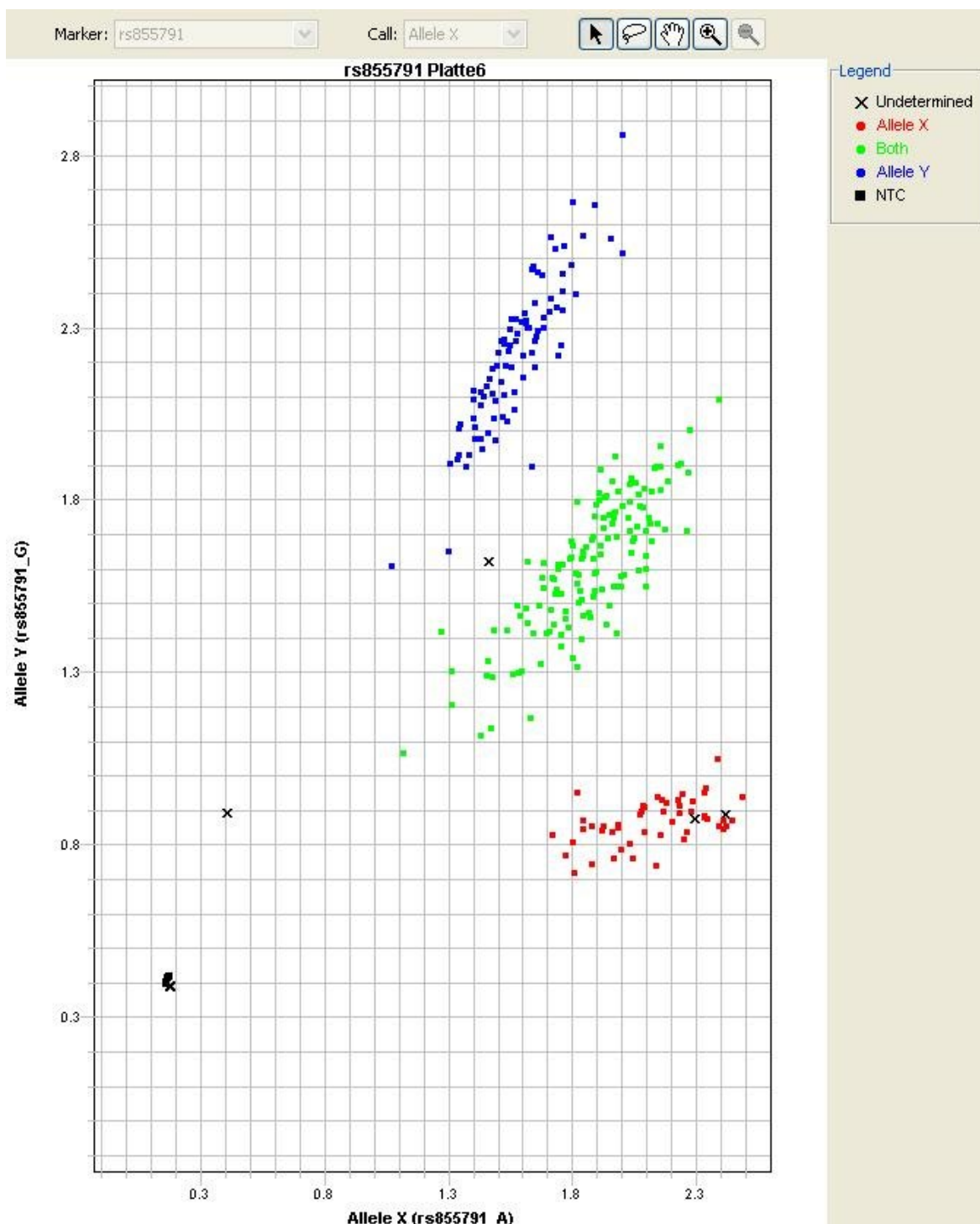


Abbildung 5: Die Abbildung 5 zeigt die allelische Diskriminierung von DNS-Proben (Platte 6) hinsichtlich des SNP rs855791 mittels Cluster-Plot. Die rote Wolke umfasst die DNS-Proben der Frühgeborenen mit einem homozygoten Wildtyp (in diesem Fall das A-Allel). Die blauen Punkte sind die DNS-Proben, bei denen ein homozygoter Genotyp für den Polymorphismus rs855791 (in diesem Fall das G-Allel) nachgewiesen werden konnte. Die grüne Wolke enthält die Frühgeborenen mit heterozygotem Genotyp. Mit einem schwarzen „X“ sind DNS-Proben gekennzeichnet, die nicht eindeutig einem Genotyp zugeordnet werden konnten. Hier fand, wenn möglich, eine manuelle Einteilung statt oder die DNS-Probe wurde nicht in der Auswertung verwendet.

7.6. Anhang 6: Tabelle 9: Klinische Daten aufgeschlüsselt für die HFE/rs1799945 Genotypen

Tabelle 9: Klinische Daten aufgeschlüsselt für die HFE/rs1799945 Genotypen

rs1799945 Genotyp	CC (niedriges Serumeisen/ hohes intestinales Eisen) n = 8330	CG (Intermediäres Serumeisen/ intermediäres intestinales Eisen) n = 2625	GG (hohes Serumeisen/ niedriges intestinales Eisen) n = 211	Total ^a n = 11.166
Gestationsalter (Wochen)	28,7 ± 2,7	28,7 ± 2,7	28,8 ± 2,6	28,7 ± 2,7
Geburtsgewicht (g)	1063 ± 303	1065 ± 300	1059 ± 303	1064 ± 302
Männliches Geschlecht	51,2	50,4	52,1	51,1
Mehrlingsgeburt	33,0	35,0	35,5	33,6
SGA	18,0	17,5	19,0	17,9
Erythropoetin	13,1	14,0	11,5	13,3
Eisen	85,7	86,4	89,6	85,9
Bluttransfusionen	40,1	40,2	43,3	40,2
Probiotika	41,3	40,3	41,2	41,0
Sepsis	12,9	13,3	12,4	13,0
NEC	2,5	2,7	1,4	2,5
FIP	1,9	2,3	3,8	2,0
IVH	16,7	17,5	17,1	16,9
ROP	3,3	3,5	2,4	3,3
Tod	3,4	2,5	3,3	3,2

SGA, small for gestational age; NEC, nekrotisierende Enterokolitis; FIP, fokale intestinale Perforation; IVH, intraventrikuläre Hämorrhagie; ROP, Retinopathia praematurorum. Werte angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung oder %. Statistische Auswertung: χ^2 -Test und t-Test. Kein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen dem Genotyp CC und GG.

^aFehlende Daten: Gestationsalter n = 2; SGA n = 3; Erythropoetin n = 38; Eisen n = 3; Bluttransfusionen n = 16; Probiotika n = 3; Sepsis n = 66; FIP n = 18; IVH n = 13; ROP n = 6.

7.7. Anhang 7: Tabelle 10: Klinische Daten aufgeschlüsselt für die HFE/rs1800562 Genotypen

Tabelle 10: Klinische Daten aufgeschlüsselt für die HFE/rs1800562 Genotypen

rs1800562 Genotyp	GG (niedriges Serumeisen/ hohes intestinales Eisen) n = 10332	GA (Intermediäres Serumeisen/ intermediäres intestinales Eisen) n = 819	AA (hohes Serumeisen/ niedriges intestinales Eisen) n = 15	Total ^a n = 11.166
Gestationsalter (Wochen)	<u>28,7 ± 2,7</u>	<u>28,9 ± 2,7</u>	<u>30,9 ± 3,0</u>	28,7 ± 2,7
Geburtsgewicht (g)	<u>1063 ± 302</u>	<u>1075 ± 304</u>	<u>1287 ± 263</u>	1064 ± 302
Männliches Geschlecht	50,9	52,7	46,7	51,1
Mehrlingsgeburt	33,5	34,7	40,0	33,6
SGA	17,7	20,1	33,3	17,9
Erythropoetin	13,3	12,5	6,7	13,3
Eisen	85,8	87,5	80,0	85,9
Bluttransfusionen	40,4	37,7	20,0	40,2
Probiotika	41,1	40,2	33,3	41,0
Sepsis	12,9	13,8	6,7	13,0
NEC	2,5	2,3	0	2,5
FIP	2,1	1,0	0	2,0
IVH	17,1	15,2	13,3	16,9
ROP	3,4	2,3	0	3,3
Tod	3,3	2,2	0	3,2

SGA, small for gestational age; NEC, nekrotisierende Enterokolitis; FIP, fokale intestinale Perforation; IVH, intraventrikuläre Hämorrhagie; ROP, Retinopathia praematurorum. Werte angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung oder %. Statistische Auswertung: χ^2 -Test und t-Test. Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen dem Genotyp GG und AA fett und unterstrichen.

^aFehlende Daten: Gestationsalter n = 2; SGA n = 3; Erythropoetin n = 38; Eisen n = 3; Bluttransfusionen n = 16; Probiotika n = 3; Sepsis n = 66; FIP n = 18; IVH n = 13; ROP n = 6.

7.8. Anhang 8: Tabelle 12: Klinische Daten aufgeschlüsselt für die kombinierten Genotypen

Tabelle 12: Klinische Daten aufgeschlüsselt für die kombinierten Genotypen

kombinierte Genotypen	Keine (niedriges Serumeisen/ hohes intestinales Eisen) n = 1473	Ein oder zwei (Intermediäres Serumeisen/ intermediäres intestinales Eisen) n = 8095	Zwei bis vier (hohes Serumeisen/ niedriges intestinales Eisen) n = 1598	Total ^a n = 11.166
Gestationsalter (Wochen)	28,6 ± 2,6	28,7 ± 2,7	28,9 ± 2,7	28,7 ± 2,7
Geburtsgewicht (g)	1052 ± 303	1063 ± 302	1078 ± 301	1064 ± 302
Männliches Geschlecht	51,4	50,8	52,2	51,1
Mehrlingsgeburt	33,6	33,1	35,7	33,6
SGA	17,7	17,7	19,0	17,9
Erythropoetin	13,1	13,5	12,2	13,3
Eisen	84,5	86,0	86,6	85,9
Bluttransfusionen	41,8	40,2	38,5	40,2
Probiotika	39,9	41,6	39,4	41,0
Sepsis	13,0	12,9	13,2	13,0
FIP	1,7	2,1	2,2	2,0
IVH	17,9	16,9	16,1	16,9
ROP	3,3	3,4	2,8	3,3
Tod	3,5	3,3	2,6	3,2

SGA, small for gestational age; FIP, fokale intestinale Perforation; IVH, intraventrikuläre Hämorrhagie; ROP, Retinopathia praematurorum. Werte angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung oder %. Statistische Auswertung: χ^2 -Test und t-Test. Kein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen dem Genotyp „keine Mutation“ und „zwei bis vier Mutationen“.

^aFehlende Daten: Gestationsalter n = 2; SGA n = 3; Erythropoetin n = 38; Eisen n = 3; Bluttransfusionen n = 16; Probiotika n = 3; Sepsis n = 66; FIP n = 18; IVH n = 13; ROP n = 6.

8. Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen Menschen bedanken, die zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben. Zunächst möchte ich mich bei *Herrn Prof. Dr. Egbert Herting*, dem Direktor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck bedanken für die Möglichkeit der Promotion in Ihrer Klinik. Von Herzen möchte ich mich bei meinem Doktorvater *Herrn Prof. Dr. Wolfgang Göpel* bedanken. Erst durch Ihren Themenvorschlag konnte ich meinen Promotionswunsch verwirklichen. Sie haben mich mit ihrer Begeisterung, ihrer Gelassenheit, ihren konstruktiven Vorschlägen und ihrem stets offenen Ohr für Fragen wunderbar während meiner Arbeitsphase betreut und beraten. Im Besonderen möchte ich mich bei Ihnen für Ihre Unterstützung bei der statistischen Auswertung bedanken. Es ist eine Freude mit Ihnen zu arbeiten und von Ihnen zu lernen. Ich danke dem *Institut für medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck* für die freundliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung unserer Daten. Dabei gilt mein besonderer Dank *Frau Dipl.-Stat. Tanja K. Rausch*. Liebe Tanja, vielen Dank für deine konstruktiven Anmerkungen und deine Geduld bei der Beantwortung meiner zahlreichen Fragen. Einen besonderen Dank möchte ich den ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des GNN-Teams *Anja Kaufmann, Tim Rönckendorf, Birgit Schröder, Petra Sperner, Christine Wolff, Liane Triebwasser, Olaf Teckenburg, Bea Hatje, Maria Klingenberg, Irene Fischer, Anja Graf und Christin Kujat* für die herzliche Aufnahme in euer Team, eure stetige Hilfsbereitschaft und gute Laune aussprechen. Ihr leistet wunderbare Arbeit. Ich danke den, an der GNN-Studie *teilnehmenden neonatologischen Zentren* sowie ihren Mitarbeitern. Herzlichst möchte ich mich zudem bei den *Familien* bedanken, die einer Teilnahme am deutschen Frühgeborenen-Netzwerk zugestimmt haben. Jede einzelne eurer Geschichten hat mich tief beeindruckt, mich in meiner Berufswahl bestärkt und nachhaltig beeinflusst. Es war eine große Freude mit Euch arbeiten zu dürfen. Abschließend möchte ich meinen Mann *Philipp*, meine Eltern *Michael und Cornelia*, meine Geschwister *Leonard und Antonia*, meinen *Opa Hans*, meine *Oma Helmi* und meine lieben *Freunde* nennen und euch meinen größten Dank aussprechen. Diese Doktorarbeit wäre unzählige Seiten länger,

wenn ich all die Dinge benennen würde, mit denen ihr mein Leben bereichert. Ihr seid mein Lebenslied.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Josephine Drese, geb. Ridder
Geburtsdatum: 24. Januar 1991
Geburtsort: Münster



Hochschulausbildung

2010-2017 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
2015 Auslandssemester in Bergen, Norwegen gefördert durch ERASMUS+
2013-2016 Wissenschaftliche Hilfskraft in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck.
2014-2020 Dissertation in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Lübeck bei Herrn Prof. Dr. W. Göpel.

August 2012: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: gut)
April 2016: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: gut)
Juni 2017: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: sehr gut)

Beruflicher Werdegang

Seit Juli 2017 Assistenzärztin in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck.

Publikation

Göpel W, Drese J, Rausch TK, Twisselmann N, Bohnhorst B, Müller A et al. (2018)
Necrotizing enterocolitis and high intestinal iron uptake due to genetic variants.
Pediatric Research 83, 57-62