

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

**Polymorphismen des angeborenen
Immunsystems bei Frühgeborenen mit
einem Geburtsgewicht unter 1500 Gramm**

Inauguraldissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Anne Margarete Högemann
aus Münster

Lübeck 2007

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

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Christoph Frohn

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2008

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 08.10.2008

**gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
-Dekan der Medizinischen Fakultät-**

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	1
1.1. Infektionen und Frühgeborene	1
1.2. Reaktion des angeborenen Immunsystems auf bakterielle Infektionen	2
1.3. CD14	5
1.4. CARD15/NOD2	6
1.5. Sepsis.....	7
1.6. Fragestellung der Arbeit	9
II. Material und Methoden	10
2.1. Allgemeine Vorgehensweisen	10
2.2. Studienpopulation.....	12
2.3. Definition der Endpunkte	12
2.4. Bestimmung der Polymorphismen.....	14
2.5. Statistik und Fallzahlschätzung	17
III. Ergebnisse.....	19
3.1. Studienpopulation.....	19
3.2. Klinische Daten in Abhängigkeit vom Genotyp.....	20
3.3. Sepsis mit positiver Blutkultur.....	25
3.4. Behandlungsdaten.....	30
3.5. Weitere Erkrankungen Frühgeborener (außer Sepsis).....	32
3.6. Analysen von Subgruppen mit besonders hohem Infektionsrisiko	35
IV. Diskussion.....	37
4.1. Generelle Aspekte zur Bewertung genetischer Assoziationsstudien	37
4.2.1. Studienpopulation	37

4.2.2. Verblindung der Studie	38
4.2.3. Reproduzierbarkeit	39
4.3. Polymorphismen des Immunsystems bei Frühgeborenen.....	39
4.3.1. CD14-159 C/T Polymorphismus	40
4.3.2. CARD15/NOD2-3020insC	43
4.4. Schlussfolgerungen und kurzer Ausblick.....	44
V. Zusammenfassung	46
VI. Literaturverzeichnis.....	47
VII. Anhang	54
Anhang 1: Aufklärungsbogen Eltern.....	54
Anhang 2: Einverständniserklärung Eltern	55
Anhang 3: Dokumentationsbogen (1/3).....	56
Anhang 4: Dokumentationsbogen (2/3).....	57
Anhang 5: Dokumentationsbogen (3/3).....	58
VIII. Danksagung	59
IX. Lebenslauf.....	60

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 LPS-induzierte Signalkaskade	3
Abb. 2 Sepsis bei Frühgeborenen in Abhängigkeit vom CD14-159 T Polymorphismus	25
Abb. 3 Sepsis bei Frühgeborenen in Abhängigkeit vom CARD15/NOD2-3020insC Polymorphismus.....	28
Abb. 4 mehrfache Sepsitiden bei Frühgeborenen in Abhängigkeit von Polymorphismen des angeborenen Immunsystems.....	30

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 PCR- Protokolle	15
Tab. 2 Restriktionsverdau	16
Tab. 3 Zusammensetzung des Polyacrylamidgels.....	16
Tab. 4 Klinische Daten von Frühgeborenen mit unterschiedlichem CD14-159 Genotyp.....	21
Tab. 5 Klinische Daten Frühgeborener mit unterschiedlichem CD14-159 Genotyp (aus jeder Mehrlingsgruppe wurde nur ein Kind berücksichtigt)	22
Tab. 6 Klinische Daten von Frühgeborenen mit unterschiedlichem CARD15/NOD2-3020insC Genotyp.....	23
Tab. 7 Klinische Daten von Frühgeborenen mit unterschiedlichem CARD15/NOD2-3020insC Genotyp (aus jeder Mehrlingsgruppe wurde nur ein Kind berücksichtigt)	24
Tab. 8 Sepsis bei Frühgeborenen mit unterschiedlichem CD14-159 Genotyp.....	26
Tab. 9 Sepsis bei Frühgeborenen mit unterschiedlichem CD14-159 Genotyp (aus jeder Mehrlingsgruppe wurde nur ein Kind berücksichtigt)	27

Tab. 10 Sepsis bei Frühgeborenen mit unterschiedlichem CARD15/NOD2-3020insC Genotyp.....	28
Tab. 11 Sepsis bei Frühgeborenen mit unterschiedlichem CARD15/NOD2-3020insC Genotyp (aus jeder Mehrlingsgruppe wurde nur ein Kind berücksichtigt)	29
Tab. 12 Behandlungsdaten von Frühgeborenen mit unterschiedlichem CD14-159 Genotyp.....	31
Tab. 13 Behandlungsdaten von Frühgeborenen mit unterschiedlichem CARD15/NOD2-3020insC Genotyp.....	32
Tab. 14 Weitere Erkrankungen (außer Sepsis) von Frühgeborenen mit unterschiedlichem CD14-159 Genotyp.....	33
Tab. 15 Weitere Erkrankungen (außer Sepsis) von Frühgeborenen mit unterschiedlichem CARD15/NOD2-3020insC Genotyp.....	34
Tab. 16 Analyse von Subgruppen mit besonders hohem Infektionsrisiko mit unterschiedlichem CD14-159 Genotyp	35
Tab. 17 Analyse von Subgruppen mit besonders hohem Infektionsrisiko mit unterschiedlichem CARD15/NOD2-3020insC Genotyp.....	36

VI. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	-	Abbildung
bp	-	Basenpaare
C	-	Cytosin
CARD 15	-	Caspase recruitment domain family, member 15
CD14	-	cluster of differentiation – Nomenklatur für Differenzierungsantigene von Leukozyten und Zellen deren Oberflächenantigene mit denen von Immunzellen identisch sind
CT	-	Computertomogramm
CTG	-	Cardiotokogramm
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
FIP	-	fokale intestinale Perforation
HLA	-	human leukocyte antigen
IL	-	Interleukin
INF- α	-	Interferon- α
IRAK	-	IL-1R-assoziierte Kinase
IUI	-	intrauterine Infektion
IVH	-	intraventrikuläre Hämorrhagie
kDa	-	Kilo-Dalton
LBP	-	Lipopolysaccharid-Binding-Proteine
LPS	-	Lipopolysaccharid
mA	-	milli-Ampere
MgCl	-	Magnesiumchlorid
MRT	-	Magnetresonanztomographie
MTA	-	medizinisch technische Assistentin
mCD14	-	membranständiges CD14
NEC	-	nekrotisierende Enterokolitis
NF- κ B	-	nuclear factor κ B

Abkürzungsverzeichnis

ng	-	Nanogramm
NK-Zellen	-	natürliche Killer-Zellen
NOD	-	nucleotide-binding oligomerization domain
PCR	-	polymerase chain reaction – Polymerasekettenreaktion
PDA	-	persistierender Ductus arteriosus
PGN	-	Peptidoglykan
PVL	-	periventrikuläre Leukomalazie
ROP	-	Neugeborenenretinopathie
sCD14	-	soluble CD14
T	-	Thymin
Tab.	-	Tabelle
TLR	-	toll-like-receptor
TNF- α -	-	Tumor-Nekrose-Faktor α
TRAF6	-	TBF-receptor-associated factor 6
ZVK	-	zentralvenöser Katheter

I. Einleitung

1.1. Infektionen und Frühgeborene

„Das schwierigste bei Frühgeborenen ist, vorauszusagen, was aus ihnen wird. Ganz sicher kann man das eigentlich nur, wenn sie in meinem Alter sind.“ (Prof. Yllpö (1887 – 1992), finnischer Neonatologe im Alter von 98 Jahren)

Auch wenn dieses Zitat aus dem Jahr 1985 stammt, besitzt seine Aussage immer noch eine bestechende Aktualität. Laut gängiger Literatur werden in Deutschland zurzeit pro Jahr circa 5% bis 8% aller Kinder zu früh, das heißt vor Vollendung der 36. Schwangerschaftswoche, geboren, wobei etwa 8000 dieser Kinder zum Zeitpunkt ihrer Geburt weniger als 1500 Gramm wiegen. Gynäkologische Studien konstatieren sowohl einen Zusammenhang zwischen 80% der extremen Frühgeburten und intrauterinen Infektionen in Folge von vorzeitigem Blasensprung (Goldenberg und Rouse 1998) als auch zwischen 20–50% der Frühgeburten im Allgemeinen mit Genitalinfektionen der Mutter (Vogel et al. 2005).

Trotz einer deutlichen positiven Entwicklung zeichnet sich gerade das Kollektiv der Frühgeborenen mit sehr geringem Geburtsgewicht durch eine stark erhöhte Morbiditäts- und Mortalitätsrate aus (McIntire et al. 1999, Nolte et al. 2000). In den letzten Jahren wurde versucht, Risikofaktoren zu identifizieren, die das Auftreten und den Verlauf der häufigsten Komplikationen begünstigen, um in Zukunft bei gefährdeten Kindern durch gezielte Prophylaxe Langzeitschäden verhindern zu können. Die Komponenten des angeborenen Immunsystems liefern zurzeit viel versprechende Ansätze für die Entwicklung möglicher Erklärungsmodelle.

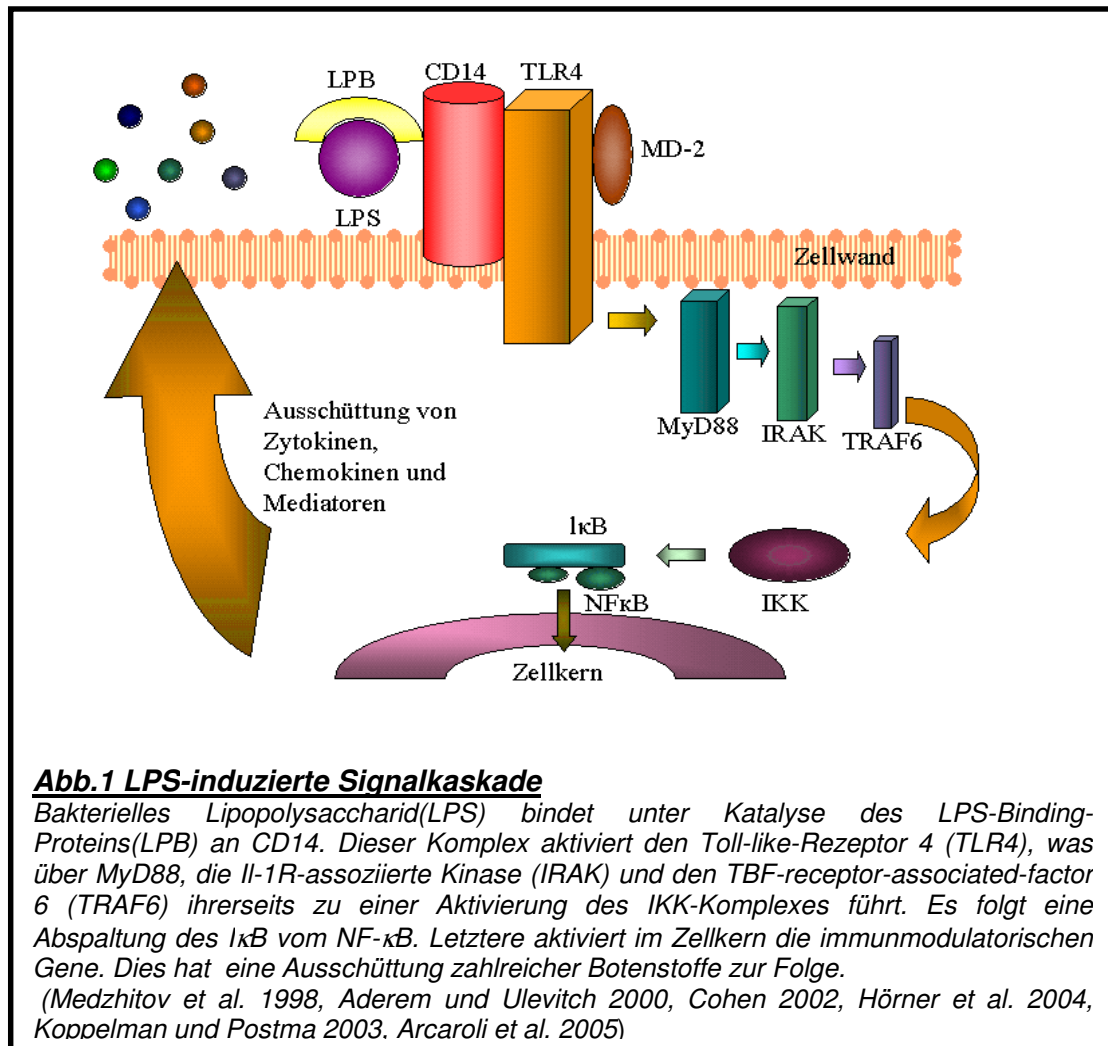
Diese Arbeit beschäftigt sich mit Polymorphismen dieses Systems und ihren Auswirkungen auf Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht unter 1500 Gramm. Als Ausgangspunkt diente die Beobachtung, dass Frühgeborene mit einem bestimmten Genotyp eine erhöhte Häufigkeit von Sepsitiden mit

positiver Blutkultur aufweisen (Ahrens et al. 2004). Es wurde untersucht, ob sich diese Assoziationen bestätigen lassen.

1.2. Reaktion des angeborenen Immunsystems auf bakterielle Infektionen

99% aller Infektionen werden wahrscheinlich allein durch das angeborene Immunsystem beherrscht (Hörner et al. 2004). Dieses entwicklungsgeschichtlich sehr alte System, zu dem unter anderem Granulozyten, Makrophagen, Monozyten, NK-Zellen und das Komplementsystem gehören, zeichnet sich durch eine hohe Aktivierungsgeschwindigkeit aus (Hörner et al. 2004). Seine Funktion beruht auf Erkennung bestimmter bakterieller Antigene, deren Bindung an Rezeptoren auf der Membran der Zellen dieses Systems zu der Auslösung einer intrazellulären Signalkaskade führt. Dies hat letztlich eine Ausschüttung verschiedener Zytokine, Hormone und Mediatoren - und damit eine Bekämpfung der Infektion - zur Folge. Bei Neugeborenen ist das angeborene Immunsystem von besonderer Wichtigkeit, da deren adaptives Immunsystem zum Zeitpunkt der Geburt noch nicht stark ausgeprägt ist (Maródi 2006).

Hauptstimulatoren des Immunsystems sind Bestandteile der bakteriellen Zellwand, die beim Zerfall der Erreger freigesetzt werden. Im Fall Gram-negativer Infektionen handelt es sich hier hauptsächlich um das sogenannte Lipopolysaccharid (LPS), bei Gram-positiven Bakterien vor allem um Peptidoglykan (PGN). LPS ist mit Hilfe des Lipids A in der äußeren Membran verankert (Cohen 2002) und wird aufgrund seiner immunstimulierenden Eigenschaften auch als Endotoxin bezeichnet. Sowohl



LPS wie auch PGN binden an einen Rezeptorkomplex aus einem Toll-like-Rezeptor (TLR) und CD14. Bei PGN handelt es sich hier um TLR2, bei LPS um TLR4 (Arcaroli et al. 2005). LPS benötigt zur Katalysierung dieser Bindung - wie auch für die Lösung derselben - (Hailman et al. 1994, Yu et al. 1997) das sogenannte Lipopolysaccharid-Binding-Protein (LBP) (Wright et al. 1990, Dziarski et al. 1998, Hörner et al. 2004).

CD14 besitzt keine eigene Transmembrankomponente (Haziot et al. 1988, Simmons et al. 1989), deshalb erfolgt die Aktivierung der Zelle über eine Dimerisierung des TLRs, welches eine intrazelluläre Signalkaskade (siehe Abb.1) in Gang setzt, die zur Transkription verschiedener proinflammatorischer und regulativer Gene führt (Hörner et al. 2004, Arcaroli

al. 2005). Handelt es sich bei der aktivierten Zelle um einen Monozyten, hat die Aktivierung der Signalkaskade eine Ausschüttung von Zytokinen (TNF- α und IL1) zur Folge, was wiederum zur Aktivierung von Endothelzellen führt (Pugin et al. 1995).

Die nucleotide-binding oligomerization domains (NOD) bilden eine vom TLR4 unabhängige Signalkaskade. Ob sie über LPS oder nur über Peptidoglykan aktiviert werden, ist noch fraglich (Inohara et al. 2001, Mc Donald 2005), da Folgeversuche die 2001 beschriebene Aktivierung über LPS mit Verunreinigungen mit PGN in der Versuchsanordnung in Zusammenhang bringen (Inohara et al. 2003, Dziarski 2003).

Im Rahmen der Immunreaktion spielen eine Vielzahl von Zytokinen (Bsp. IL1, IL6, IL12, TNF- α etc.), Chemokinen (IL8 etc.) und Mediatoren (Prostaglandine, Platelet-activating-factor, Leukotriene, Thromboxane, Radikale) eine Rolle, die über verschiedene Mechanismen entzündungsfördernd und immunaktivierend wirken. So führt zum Beispiel IL12 zu einer Differenzierung von CD4-positiven zu IFN- α -produzierenden Zellen und damit zu einer Aktivierung des erworbenen Immunsystems (Macatonia et al. 1995). Außerdem können sie über Herunterregulierung von gerinnungshemmenden Substanzen wie Antithrombin und Protein C die Koagulation fördern (Cohen 2002).

Die Bedeutung der einzelnen Komponenten für eine funktionstüchtige Abwehr bakterieller Infektionen ist vor allem durch eine Reihe von Knockout-Versuchen an Tieren nachgewiesen worden. So wurde zum Beispiel an Mäusen gezeigt, dass ohne TLR4 und MD-2 keine Zellreaktion in Form von NF- κ B-Ausschüttung stattfindet (Shimazu et al. 1999, Inohara et al. 2001).

Darüber hinaus wurde in verschiedenen Studien belegt, dass eine LPS-Exposition beziehungsweise eine Gram-negative Sepsis zu erhöhten CD14- (Landmann et al. 1995) und IRAK- (Takeuchi et al. 1999) Spiegeln führt.

1.3. CD14

1988 wurde das auf dem Chromosom 5 liegende und aus 1367 Nukleotiden bestehende CD14 codierende Gen sequenziert. Im gleichen Jahr identifizierten Goyert et al. das codierte Protein als Rezeptor, der auf Monozyten, Makrophagen und aktivierten Granulozyten expremiert wird. CD14 kommt in einer membranständigen und einer löslichen Form vor. Die membranständige Form - mCD14 - ist über ein Phosphatidylinositol-phospholipid an die Zellmembran gebunden (Haziot et al. 1988, Simmons et al. 1989). Die lösliche Form - sCD14 - existiert in zwei Isoformen, die sich in ihrem Molekulargewicht (49 und 55 kDa) unterscheiden (Landmann et al. 1995). Eine Aktivierung erfolgt, wie oben beschrieben, über Bruchstücke (patterns) von Gram-positiven, Gram-negativen und Mycobakterien (Pugin et al. 1994). Bei sCD14 führt die Komplexbildung mit LPS und LPB zur Aktivierung anderer, nicht CD14-tragender Zellen (zum Beispiel Endothel) (Frey et al. 1992, Loppnow et al. 1995, Tapping et al. 1997).

CD14 werden auch andere als die oben genannten Funktionen zugeschrieben. So spielt der mCD14-Rezeptor eine Rolle bei der Erkennung von apoptotischen Zellen, indem diese an der LPS-Bindungsstelle mit CD14 interagieren, was zu einer Phagozytose derselben führt (Devitt et al. 1998). sCD14 scheint außerdem eine Rolle im Transport von Phosphatidylethanolaminen zu spielen (Yu et al. 1997).

Zurzeit werden Polymorphismen innerhalb des Gens und der Promotorregion von CD14 in unterschiedlichen Zusammenhängen untersucht. Diese Arbeit beschäftigt sich mit einem Polymorphismus an Position 159 des Promotors. Dieser tritt in der Allgemeinbevölkerung in zwei Allelen auf, die an dieser Position entweder Cytosin oder Thymin aufweisen (Unkelbach et al. 1999). In der Literatur werden unter anderem Assoziationen zwischen dem 159 T Allel und Myokardinfarkten (Unkelbach et al. 1999), cerebralen Ischämien (Ito et al. 2000) sowie einer generellen Neigung zu Atopie kontrovers diskutiert (Koppelman und Postma 2003, Kabesch et al. 2004, Lange et al. 2005,

Kabesch 2006). Des Weiteren wird dieser Polymorphismus häufig mit überschießenden Entzündungsreaktionen und der Entwicklung von Sepsitiden in Verbindung gebracht. So war das CD14-159 T Allel in einer Studie im Jahr 2005 bei erwachsenen Patienten einer Intensivstation bei Einlieferung signifikant häufiger mit positiven Bakterienkulturen vergesellschaftet (Sutherland et al. 2005). Beschrieben wurde auch eine eventuelle Risikoerhöhung für septischen Schock (Gibot et al. 2002). Ob zudem die Prävalenz von Infektionen im Allgemeinen erhöht ist, bleibt zurzeit fraglich (Hubacek et al. 2000, Agnese et al. 2002, Sutherland et al. 2005). Allerdings wurde gezeigt, dass das 159 T Allel sowohl ohne als auch mit LPS-Stimulation zu höheren CD14-Spiegeln (Kabesch et al. 2004, LeVan et al. 2001) führt, was auf eine Affinitätsänderung zu dem Repressormolekül Sp3 zurückzuführen ist (LeVan et al. 2001). Die signifikant höheren sCD14-Level bei Patienten mit dem TT-Genotyp sind außerdem mit niedrigen IL4 und hohen IFN- γ -Spiegeln vergesellschaftet (Baldini et al. 1999). Höhere sCD14-Konzentrationen im Blut waren darüber hinaus in einer Studie an Patienten mit Gram-negativer Sepsis mit erhöhter Letalität assoziiert (Landmann et al. 1995). Im Gegenzug wiesen Primaten in einem Versuch mit Antikörpern gegen CD14 nach starker LPS-Exposition schneller wieder Blutdrücke im Normalbereich und geringere TNF- α -, IL1 β -, IL6- und IL8-Spiegel auf als die Kontrollgruppe (Leturcq et al. 1996).

In Hinsicht auf die Ursachen der Frühgeburtlichkeit scheint allerdings kein Zusammenhang zwischen dem CD14-159 T Genotyp bei der Mutter und dem Erwerb intrauteriner Infektionen zu bestehen (Härtel et al. 2004).

1.4. CARD 15/NOD2

Im Jahr 2001 wurde das auf dem q-Arm des Chromosoms 16 liegende CARD15/NOD2 codierende Gen entdeckt und als in vor allem in Monozyten vorkommendes intrazelluläres Protein identifiziert (Ogura et al. 2001). Noch

im gleichen Jahr wurden Polymorphismen dieses Gens durch zwei unabhängige Arbeitsgruppen als wichtige genetische Risikofaktoren für die Entwicklung eines Morbus Crohn erkannt (Hugot et al. 2001, Ogura et al. 2001). Die beste Assoziation wies dabei die Insertion eines Cytosins an Position 3020 des Gens auf. In einer Vielzahl von Folgeuntersuchungen, zuletzt auch in genomweiten Assoziationsanalysen (The Wellcome Trust Case Control Consortium 2007) konnte dieser Zusammenhang bestätigt werden. Wie oben bereits ausgeführt, besitzt auch CARD15/NOD2 eine Bindungsdomäne für Partikel der bakteriellen Zellwand und scheint eine wichtige Rolle in der Abwehr invasiver bakterieller Infektionen zu spielen (Pan et al. 2006). Eine Erhöhung des intrazellulären Proteins NF- κ B (siehe Abb.1) nach Aktivierung von CARD15/NOD2 hatte schon 2001 einen Hinweis auf diesen Zusammenhang gegeben (Ogura et al. 2000, Ogura et al. 2001). Kürzlich wurde auch über eine erhöhte Letalität von erwachsenen Patienten mit Sepsis berichtet, die den 3020insC-Polymorphismus des CARD15/NOD2-Gens tragen (Brenmoehl et al. 2007).

1.5 Sepsis

Bei durchschnittlich einem Fünftel aller Patienten, die auf eine Intensivstation verlegt werden, wird eine Sepsis diagnostiziert. Bei 45 % der Fälle werden in den Blutkulturen Gram-negative Erreger nachgewiesen (Alberti et al. 2002). Unter einer Sepsis versteht man das Versagen der körpereigenen Regulationskapazität (host defense failure) im Rahmen einer Infektion (Hörner et al. 2004). Sie zeichnet sich vor allem durch überschießende systemische Entzündung und Gerinnung sowie ihren biphasischen Verlauf - nach der Inflammation folgt eine Phase der Immunsuppression - aus (Hörner et al. 2004, Arcaroli et al. 2005). Das Multiorganversagen, welches bei Sepsis letztlich häufig zum Tode führt, ist eine Folge sowohl vaskulärer

Instabilität durch Chemotaxis, freie Radikale und Entzündungsmediatoren als auch erhöhter Koagulation, Fieber und Vasodilatation (Cohen 2002).

Genetische Polymorphismen spielen für die Erkennung bakterieller Strukturen, die Intensität der Entzündungsreaktion, die Klinik sowie das Outcome einer Sepsis eine wesentliche Rolle (Dahmer et al. 2005). So führen Mutationen im TLR4-Gen zu einer langsameren und schwächeren Immunreaktion bei inhalativer LPS-Exposition (Arbour et al. 2000). In Voruntersuchungen an Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1500 Gramm waren sowohl der homozygote CD14-159 T Polymorphismus als auch der heterozygote CARD15/NOD2-3020insC Polymorphismus mit dem gehäuften Auftreten einer Sepsis assoziiert (Ahrens 2004). Allerdings lagen zu den damals untersuchten Frühgeborenen keine detaillierten Informationen bezüglich des Zeitpunktes der Sepsis und anderer Therapiemodalitäten vor. Dies ist von besonderem Interesse, da bei Früh- und Neugeborenen je nach dem Zeitpunkt des Auftretens der ersten Symptome zwei Formen unterschieden werden. Bei der Frühform – der sogenannten „early-onset-Sepsis“ – handelt es sich um Infektionen, die kurz vor oder unter der Geburt aquiriert werden. Typische Erreger sind Streptokokken der Serogruppe B und Escherichia coli. Bei der Spätform – der sogenannten late-onset-Sepsis – handelt es sich um Infektionen, die in einem gewissen zeitlichen Abstand zur Geburt auftreten - die meisten Autoren nehmen hier einen Zeitraum von 72 Stunden an - so dass eine Infektion vor oder unter der Geburt unwahrscheinlich ist. Größtenteils handelt es sich um nosokominale Infektionen mit Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus und E. coli. Während für die early-onset-Sepsis des Frühgeborenen keine sicheren prophylaktischen Maßnahmen bekannt sind, ist die late-onset-Sepsis eine Erkrankung, für die, insbesondere bei entsprechend eingegrenzten Risikokollektiven, eine Vielzahl von prophylaktischen Maßnahmen anwendbar ist. Darüber hinaus tritt die late-onset-Sepsis wesentlich häufiger auf als die early-onset-Sepsis.

1.6. Fragestellung der vorliegenden Arbeit:

1. Sind/Ist bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1500 Gramm

- der homozygote CD14-159 T Polymorphismus

und/oder

- der heterozygote/homozygote CARD15/NOD2-3020insC Polymorphismus

mit dem Auftreten

- einer Sepsis mit positiver Blutkultur generell

oder

- speziell einer late-onset-Sepsis (nach der 72. Lebensstunde) mit positiver Blutkultur

assoziiert?

2. Bestehen weitere Assoziationen der genannten Polymorphismen mit schweren Erkrankungen des Frühgeborenen, insbesondere Operationen und Hirnblutungen?

II. Material und Methoden

2.1 Allgemeine Vorgehensweisen

Im Rahmen der multizentrischen prospektiven Studie „Krankheitsbezogene Analyse von Kandidaten - Polymorphismen für schwere Erkrankungen des Frühgeborenen“ wurden von September 2003 bis Mai 2007 Daten

- zu den Umständen der Geburt (Diagnose des behandelnden Gynäkologen)
- dem Krankheitsverlauf
- der Therapie und Medikation
- sowie ein Mundschleimhautabstrich

von Frühgeborenen aus 13 deutschen neonatologischen Intensivstationen in Lübeck zentral gesammelt.

Zuvor hatten die Eltern der Speicherung der Daten der Kinder und der Entnahme des Mundschleimhautabstrichs nach einer ausführlichen mündlichen und schriftlichen Aufklärung (Anhang 1) mit einem unterschriebenen Aufklärungsbogen zugestimmt (Anhang 2).

Die an der Studie teilnehmenden Zentren zeichneten sich durch ihre Größe und durch die geforderte Fallzahl von mindestens 40 Frühgeborenen unter 1500g pro Jahr aus. Darüber hinaus wurde aufgrund möglicher pharmakokinetischer Anschlussstudien und der Verlässlichkeit der Daten auf einen ständigen Zugang zu Ultraschall-, Notfalllabor- und Röntgendiagnostik Wert gelegt.

Die Erfassung der Daten wurde mittels dreier standardisierter Dokumentationsbögen vorgenommen (Anhang 3–5). Nach Einschluss des Kindes in die Studie wurde der erste Bogen (1/3) zusammen mit dem Mundschleimhautabstrich nach Lübeck geschickt. Zeitnah erfolgte eine

Isolierung der DNA, welche nach diesem Vorgang bis zur weiteren Verwendung eingefroren wurde.

Nach der Entlassung des Kindes wurden der zweite und dritte Dokumentationsbogen nach Lübeck geschickt. Die Einverständniserklärungen verblieben mit Kopien der Bögen im behandelnden Zentrum.

Zur Qualitätssicherung wurden die Daten anhand der Patientenakten halbjährlich von einem in Lübeck auf der neonatologischen Intensivstation arbeitenden Arzt vor Ort auf Richtigkeit und Vollständigkeit überprüft und das Vorliegen der Einverständniserklärung kontrolliert. Lag letztere nicht vor, wurde das Kind nicht in die Studie aufgenommen. Zur Erhebung der Einschlussrate der Zentren wurde außerdem vom Monitor das Stationsbuch auf Patienten gescreent, die die Einschlusskriterien erfüllten. Waren Kinder trotz Erfüllung der Einschlusskriterien nicht eingeschlossen worden, wurden diese anonym mit Geburtsgewicht, einigen Outcomeparametern (z.B. Sepsis, IVH und Tod) sowie dem Grund des fehlenden Einschlusses registriert.

Die Datenbögen wurden nach dem Monitoring unter Verwendung der DNA-Nummern in eine Access-Datenbank übertragen, die den Proben nach Eingang im Labor zugeordnet worden waren. Die Datenbank ist somit vollständig anonym und enthält keine Namen oder Geburtsdaten. Die Eingabe erfolgte doppelt mit computergestütztem Abgleich der Datenbanken auf Eingabefehler.

Alle in dieser Studie genutzten Verfahrensweisen wurden von der lokalen Ethikkommission genehmigt (Aktenzeichen der Ethikkommission Lübeck: 99-047).

2.2. Studienpopulation

Einschlusskriterien waren ein Gestationsalter zwischen 24+0 und 36+6 Schwangerschaftswochen sowie ein Geburtsgewicht unter 1500 Gramm. Kinder mit einem Gestationsalter von 23+6 oder jünger wurden erst ab August 2006 routinemäßig eingeschlossen. Als Ausschlusskriterien galten letale Fehlbildungen (z.B. Trisomie 13,18; Pottersequenz) oder die Verlegung aus einer anderen Klinik.

2.3. Definition der Endpunkte

Folgende Endpunkte sind im Studienprotokoll definiert, beziehungsweise aus den im Rahmen der Studie erhobenen Angaben berechnet worden:

Sepsis mit positiver Blutkultur:	Klinische Zeichen einer Sepsis (z.B. reduzierte Mikrozirkulation, Atemstörung etc.) und zusätzlich Nachweis des Erregers in der Blutkultur
Early-onset-Sepsis:	Auftreten einer Sepsis innerhalb der ersten 72 Lebensstunden
Late-onset-Sepsis:	Auftreten einer Sepsis nach der 72. Lebensstunde
Beatmung:	Beatmung des Kindes während des stationären Aufenthaltes (unabhängig von der Ursache der Beatmung)
Bronchopulmonale Dysplasie:	Sauerstoffbedarf > 21% im korrigierten Alter von 36+0 Schwangerschaftswochen post menstruationem

Intraventrikuläre Hämorrhagie (IVH) wurde in vier Grade eingeteilt:

Grad 1:	Subependymale Blutung
Grad 2:	Blutung im Ventrikelsystem ohne Dilatation, die weniger als 50% des Ventrikellumens einnimmt
Grad 3:	Blutung im Ventrikelsystem, die mehr als 50% des Lumens einnimmt, oder mit Dilatation
Grad 4:	Blut im Ventrikelsystem mit parenchymaler Beteiligung
Periventrikuläre Leukomalazie (PVL):	Eine oder mehrere echodichte Läsionen, die sich zu einer porencephalischen Zyste entwickeln
Operationen:	Alle während des stationären Aufenthaltes durchgeführten Operationen

2.4. Bestimmung der Polymorphismen

Nach Eingang der Mundschleimhautabstriche (je zwei pro Kind und Mutter) im Labor wurde mittels des QIAamp® DNA Mini Kits der Firma QIAGEN die DNA isoliert und bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Die DNA-Isolierung mit Hilfe dieses Kits beruht auf dem Prinzip der Adsorptions-Chromatographie.

Zur Bestimmung der Polymorphismen wurden die Proben einer herkömmlichen Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) (Protokolle siehe Tab.1) unterzogen.

Primer für CD14(159) (MWG Biotech AG) (Baldini et al. 1999)

forward	5'-GTG CCA ACA GAT GAG GTT CAC-3'
revers	5'-GCC TCT GAC AGT TTA TGT AAT C-3'

Primer für CARD15/NOD2 (MWG Biotech AG) (Ogura et al. 2001)

forward	5'-CTG AGC CTT TGT TGA TGA GC-3'
revers	5'-TCT TCA ACC ACA TCC CCA TT-3'

Das aus 497 Basenpaaren (bp) bestehende PCR-Produkt der Bestimmung des CD14-159 Genotyps entsprach dem zu untersuchenden Intervall bp – 513/bp – 17.

Das PCR-Produkt des CARD15/NOD2 Genotyps enthielt 533bp und umgab die gesuchte Position 3020.

Tabelle 1: PCR-Protokolle

Reagenz	Hersteller	CD14-159	CARD15/NOD2
Aqua dest.		14,3 µl	-
10 x PCR Puffer	Invitrogen TM life technologies	2,0 µl	2,0 µl
MgCl ₂ (50mM)	Invitrogen TM life technologies	0,6 µl	0,6 µl
Desoxynucleotide Solution Mix (10mM)	New England Biolabs ® Inc.	0,5 µl	0,5 µl
Primer forward	MWG – Biotech AG	1,0 µl (Verdünnung 1:5)	0,5 µl (Verdünnung 1:2,5)
Primer revers	MWG – Biotech AG	1,0 µl (Verdünnung 1:5)	0,5 µl (Verdünnung 1:2,5)
Platinum Taq DNA-Polymerase konz. 5 U/µl	invitrogen TM life technologies	0,1 µl	0,1 µl
DNA – Probe		1,0 µl	1,0 µl
Zyklen (Denaturierung 92°C 30sec.; Annealing; Elongation 72°C, 60sec.)	MJ Research PTC – 200 Peltier Thermal Cycler	28	33
Annealing Temperatur		60°C	60°C

Nach dem Restriktionsverdau (Tab. 2) wurde die Probe auf ein Polyacrylamidgel aus Eigenherstellung (Tab. 3) aufgetragen und 50 Minuten bei 50 mA elektrophoretisch getrennt. Nach Entwicklung mit Silbernitrat und Formaldehyd wurden die Gele auf einem Lichtkasten manuell ausgewertet. Bei nicht eindeutigen Ergebnissen wurde die Bestimmung der Probe wiederholt.

Tabelle 2: Restriktionsverdau (2 Stunden bei 37°C)

Reagenz	Hersteller	CD14-159	CARD15/NOD2
10x NEB 4 Puffer	New England Biolabs ®Inc	2,6µl	2,0µl
100x BSA Puffer	New England Biolabs ®Inc	-	0,5 µl
Ava II 10.000 U/ml	New England Biolabs ®Inc	0,4µl	-
Nla IV-digest	New England Biolabs ®Inc	-	1,0 µl
zur Probe zuzusetzende Menge		je 3µl	je 3,5µl

Tabelle 3: Zusammensetzung des Polyacrylamidgels (Trägerfolie GelBond PAG – Film, Erstarrungszeit 30 min.)

Reagenz	Menge
Aqua dest.	98,00 ml
Glycerin 100% wasserfrei	9,00 ml
5x TBE	35,80 ml
Polyacrylamid	4,50 ml
Ammoniumpersulfat 10%	120,00 µl
Themed	8,24 µl

2.5. Statistik und Fallzahlschätzung

Zur Schätzung der notwendigen Fallzahl für die Prüfung der oben formulierten Fragestellung konnten wir auf Daten aus vorhergehenden Studien zurückgreifen (Ahrens et al. 2004). Bei der Fallzahlschätzung ist allerdings zu berücksichtigen, dass in der Voruntersuchung – aufgrund einer häufig angewandten prophylaktischen antibiotischen Therapie – eine untypisch niedrige Prävalenz von Sepsistiden festgestellt wurde. Wir kalkulierten jeweils die notwendige Fallzahl für folgendes Modell:

- Häufigkeit des CD14-159 TT Polymorphismus: 20%
- geschätzte Häufigkeit der Sepsis bei Kindern mit CD14-159 TT: 30%
- geschätzte Häufigkeit der Sepsis bei Kindern mit CD14-159 CT oder CC: 17%
- Alpha-Fehler $< 0,01$
- Power $> 80\%$
- zweiseitige Testung

Auf der Grundlage dieser Annahme ist eine Fallzahl von 721 untersuchten Kindern ausreichend zur Prüfung der Hypothese. Analog schätzten wir die Häufigkeit für den homozygoten oder heterozygoten CARD15/NOD2-3020insC-Polymorphismus auf 4%, die Sepsishäufigkeit in diesem Kollektiv auf 39% versus 17% bei Trägern des Wildtyp-Allels. Basierend auf diesen Schätzungen ist die Untersuchung von 1046 Frühgeborenen ($\alpha < 0,01$, Power $> 80\%$) zur Prüfung der Hypothese ausreichend.

Zur Fallzahlschätzung verwendeten wir das Programm PASS. Zur statistischen Analyse der Daten wurde die SPSS-Software (Version 15) herangezogen.

Die Hypothese der Arbeit wurde mit dem Fisher's exact test geprüft. Für die Analyse bezüglich des primären Endpunktes wurden die Daten aller eingeschlossenen Frühgeborenen ausgewertet.

Da es sich bei der vorliegenden Arbeit um die erste Genotypisierung einer so detailliert beschriebenen Gruppe von Frühgeborenen bezüglich der beiden untersuchten Polymorphismen handelt, wurden ferner der homozygote CD14-159 TT Genotyp und der heterozygote bzw. homozygote CARD15/NOD2-3020insC Polymorphismus auf eine Reihe von Behandlungs- und Outcomeparametern statistisch geprüft. Da in diesen Analysen der Einschluss von Zwillingsgruppen (oder höhergradigen Mehrlingsgruppen) aufgrund der engen Verwandtschaft der Kinder Pseudoassoziationen vorspiegeln kann (Härtel et al. 2006), sind sämtliche Statistiken für alle Einlinge, unter Einschluss jeweils eines zufällig ausgewählten Kindes aus jeder Mehrlingsgruppe dargestellt worden. Für diese Testungen wurden der Fisher's exact test und der Mann-Whitney-U-test eingesetzt. Alle in dieser Arbeit genannten p-Werte sind zweiseitig.

III. Ergebnisse

3.1. Studienpopulation

Im genannten Zeitraum von September 2003 bis Juni 2007 erfüllten in den teilnehmenden Zentren 1910 Kinder die Einschlusskriterien. Aus diesem Kollektiv wurden 1465 Frühgeborene (76%) in die Studie aufgenommen. 445 Frühgeborene wurden aufgrund fehlender Rekrutierung (n=282), schnellem Tod (n= 100), fehlendem Einverständnis der Eltern (n=34) und anderen Gründen (wie zum Beispiel mangelndem Sprachverständnis der Eltern, n=29) nicht erfasst. Da uns aber trotzdem für die betroffenen Kinder die wichtigsten Outcomeparameter vorlagen, prüften wir, ob sich die Sepsisrate mit positiver Blutkultur zwischen eingeschlossenen und nicht eingeschlossenen Kindern unterschied. Unsere Intention war es festzustellen, ob Frühgeborene mit ungünstigen Verläufen selektiv nicht eingeschlossen worden waren. Hier konnten wir keinen statistisch signifikanten Unterschied nachweisen (Sepsishäufigkeit 19,6% versus 17,2% bei nicht eingeschlossenen Frühgeborenen).

Die CD14 Polymorphismusbestimmung war in 1396 Fällen (95,2%), die Bestimmung des CARD15/NOD2 Polymorphismus in 1416 Fällen (96,6%) erfolgreich.

3.2. Klinische Daten in Abhängigkeit vom Genotyp

Die Genotypen der untersuchten Polymorphismen waren in unserem Kollektiv folgendermaßen verteilt:

- CD14-159 CC: n=394 (28%)
- CD14-159 CT: n=696 (50%)
- CD14-159 TT n=306 (22%)

- CARD15/NOD2-3020 Wildtyp n=1336 (94,4%)
- CARD15/NOD2-3020insC heterozygot n=78 (5,5%)
- CARD15/NOD2-3020insC homozygot n=2 (0,1%)

Die Kollektive entsprechen somit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Die Tabellen 4-7 stellen wichtige klinische Daten der Frühgeborenen in Abhängigkeit vom Genotyp dar. Wie bereits erläutert, werden in den Tabellen 4 und 6 die Gesamtdaten aller Kinder gezeigt, während in den Tabellen 5 und 7 aus jeder Mehrlingsgruppe nur ein zufällig ausgewähltes Kind in die Analyse eingeschlossen wurde.

Tabelle 4: Klinische Daten von Frühgeborenen mit unterschiedlichem CD14-159 Genotyp

	Gesamt n=1396	CD14-159 CC n=394	CD14-159 CT n=696	CD14-159 TT n=306	p [#]
Geburtsgewicht* [g]	1084 / 289	1098 / 298	1078 / 286	1079 / 284	0,6
Gestationsalter* [Wochen]	28,9 / 2,6	29,1 / 2,6	28,9 / 2,6	28,6 / 2,5	0,02
Mädchen [%]	47	46	49	44	0,7
Mehrling [%]	33	31	34	32	0,9
Herkunft der Mutter Deutschland [%]	74	72	76	73	0,5
Antenatale Tokolyse [%]	60	60	57	67	0,008
Antenatale antibiotische Therapie [%]	44	43	42	48	0,059
Geburtsursachen §					
Unhemmbare Wehen [%]	36	35	34	42	0,015
Amnioninfektionssyndrom [%]	23	21	23	27	0,068
EPH-Gestose [%]	12,5	15	12,6	8,8	0,031
Pathologisches CTG [%]	28	28	28	27	0,6
Plazentalösung [%]	7,5	6,9	7,6	8,2	0,6
sonstiger Grund [%]	54	54	56	50	0,1

* Mittelwert / Standardabweichung, § Mehrfachnennungen waren möglich, die Summe der Geburtsursachen ist deshalb >100%, [#] CD14-159 CC oder CT vs. CD14-159 TT, Mann-Whitney-U-test für Gestationsalter und Geburtsgewicht, Fisher's exact test für alle anderen Parameter.

Signifikante Unterschiede in der Statistik fanden sich für das Gestationsalter (Genotyp CD14-159 TT: geringeres Gestationsalter), die Häufigkeit einer antenatalen Tokolyse und die Geburtsursachen unhemmbare Wehen und EPH-Gestose. Dies war auch zu beobachten, wenn von jeder Mehrlingsgruppe nur ein Kind analysiert wurde (Tabelle 5).

Tabelle 5: Klinische Daten von Frühgeborenen mit unterschiedlichem CD14-159 Genotyp (aus jeder Mehrlingsgruppe wurde nur ein Kind berücksichtigt)

	Gesamt n=1177	CD14-159 CC n=337	CD14-159 CT n=587	CD14-159 TT n=253	p [#]
Geburtsgewicht* [g]	1078 / 290	1093 / 299	1073 / 289	1071 / 281	0,5
Gestationsalter* [Wochen]	28,9 / 2,6	29,1 / 2,6	28,9 / 2,7	28,5 / 2,5	0,01
Mädchen [%]	47	47	48	44	0,4
Mehrling [%]	20	20	22	19	0,4
Herkunft der Mutter Deutschland [%]	74	72	76	73	0,8
Antenatale Tokolyse [%]	59	58	55	67	0,003
Antenatale antibiotische Therapie [%]	42	42	40	48	0,031
Geburtsursachen §					
Unhemmbare Wehen [%]	34	32	32	41	0,014
Amnioninfektionssyndrom [%]	24	22	23	28	0,134
EPH-Gestose [%]	13,8	16,3	14,3	9,1	0,014
Pathologisches CTG [%]	30	31	31	30	0,9
Plazentalösung [%]	8,1	7,4	8,0	9,1	0,5
sonstiger Grund [%]	53	54	54	50	0,2

* Mittelwert / Standardabweichung, § Mehrfachnennungen waren möglich, die Summe der Geburtsursachen ist deshalb >100%, # CD14-159 CC oder CT vs. CD14-159 TT, Mann-Whitney-U-test für Gestationsalter und Geburtsgewicht, Fisher's exact test für alle anderen Parameter.

Da nur 2 Frühgeborene mit homozygotem CARD15/NOD2-3020insC Polymorphismus gefunden wurden, sind diese Fälle mit den heterozygoten Kindern zusammengefasst worden. Tabelle 6 gibt zunächst eine Übersicht über alle Frühgeborenen.

Tabelle 6: Klinische Daten von Frühgeborenen mit unterschiedlichem CARD15/NOD2-3020insC Genotyp

	Gesamt n=1416	NOD2-3020insC Wildtyp n=1336	NOD2-3020insC hetero/homozygot n=80	p [#]
Geburtsgewicht* [g]	1081 / 288	1083 / 289	1058 / 272	0,3
Gestationsalter* [Wochen]	28,9 / 2,6	28,9 / 2,6	28,9 / 2,7	0,9
Mädchen [%]	47	47	47	1
Mehrling [%]	33	33	40	0,18
Herkunft der Mutter Deutschland [%]	74	74	83	0,063
Antenatale Tokolyse [%]	60	61	50	0,059
Antenatale antibiotische Therapie [%]	44	44	39	0,48
Geburtsursachen [§]				
Unhemmbare Wehen [%]	36	37	27	0,094
Amnioninfektionssyndrom [%]	23	23	21	0,68
EPH-Gestose [%]	12,6	12,9	6,3	0,083
Pathologisches CTG [%]	28	28	30	0,7
Plazentalösung [%]	7,7	7,6	8,8	0,6
sonstiger Grund [%]	54	54	58	0,4

* Mittelwert / Standardabweichung, [§] Mehrfachnennungen waren möglich, die Summe der Geburtsursachen ist deshalb >100%, [#] CARD15/NOD2-3020 Wildtyp vs. CARD15/NOD2-3020insC hetero- oder homozygot, Mann-Whitney-U-test für Gestationsalter und Geburtsgewicht, Fisher's exact test für alle anderen Parameter.

Im Gegensatz zum CD14-Polymorphismus ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der untersuchten klinischen Daten. Wenn von jeder Mehrlingsgruppe nur ein Kind analysiert wurde, fanden sich nur für die zuvor grenzwertigen Assoziationen „Mehrling“ und „Herkunft der Mutter aus Deutschland“ signifikante Differenzen (Tabelle 7).

Tabelle 7: Klinische Daten von Frühgeborenen mit unterschiedlichem CARD15/NOD2-3020insC Genotyp (aus jeder Mehrlingsgruppe wurde nur ein Kind berücksichtigt)

	Gesamt n=1192	NOD2-3020insC Wildtyp n=1123	NOD2-3020insC hetero/homozygot n=69	p [#]
Geburtsgewicht* [g]	1076 / 290	1077 / 292	1058 / 269	0,4
Gestationsalter* [Wochen]	28,9 / 2,6	28,9 / 2,6	28,9 / 2,7	0,9
Mädchen [%]	47	47	47	1
Mehrling [%]	20	20	30	0,047
Herkunft der Mutter Deutschland [%]	74	74	85	0,032
Antenatale Tokolyse [%]	58	59	50	0,2
Antenatale antibiotische Therapie [%]	42	42	36	0,37
Geburtsursachen §				
Unhemmbare Wehen [%]	34	34	27	0,24
Amnioninfektionssyndrom [%]	23	24	19	0,38
EPH-Gestose [%]	13,9	14,3	7,2	0,10
Pathologisches CTG [%]	30	30	32	0,7
Plazentalösung [%]	8,3	8,2	10,1	0,5
sonstiger Grund [%]	53	53	59	0,4

* Mittelwert / Standardabweichung, § Mehrfachnennungen waren möglich, die Summe der Geburtsursachen ist deshalb >100%, # CARD15/NOD2-3020 Wildtyp vs. CARD15/NOD2-3020insC hetero- oder homozygot, Mann-Whitney-U-test für Gestationsalter und Geburtsgewicht, Fisher's exact test für alle anderen Parameter.

3.3. Sepsis mit positiver Blutkultur

In den Abbildungen 2 und 3 werden die Daten bezüglich der primären Endpunkte „Sepsis mit positiver Blutkultur“ und „Late-onset-Sepsis“ in Abhängigkeit vom Genotyp dargestellt. Die Tabellen 8–10 bieten eine Übersicht über die Häufigkeit der Gram-positiven und Gram-negativen Infektionen und einer Operation aufgrund nekrotisierender Enterokolitis. Die nekrotisierende Enterokolitis wurde in diese Tabelle mit aufgenommen, da sie in aller Regel mit einer schweren Infektion einhergeht.

Ferner wird der Endpunkt „Tod“ für das Gesamtkollektiv dargestellt. Da bei Erwachsenen mit dem CARD15/NOD2-3020insC Genotyp eine erhöhte Mortalität bei septischen Patienten beschrieben worden war (Brenmoehl et al. 2007), wurde auch die Häufigkeit des Todes bei Patienten mit Sepsis analysiert, hierfür ergaben sich jedoch im Vergleich für keinen Genotyp statistisch signifikante Unterschiede.

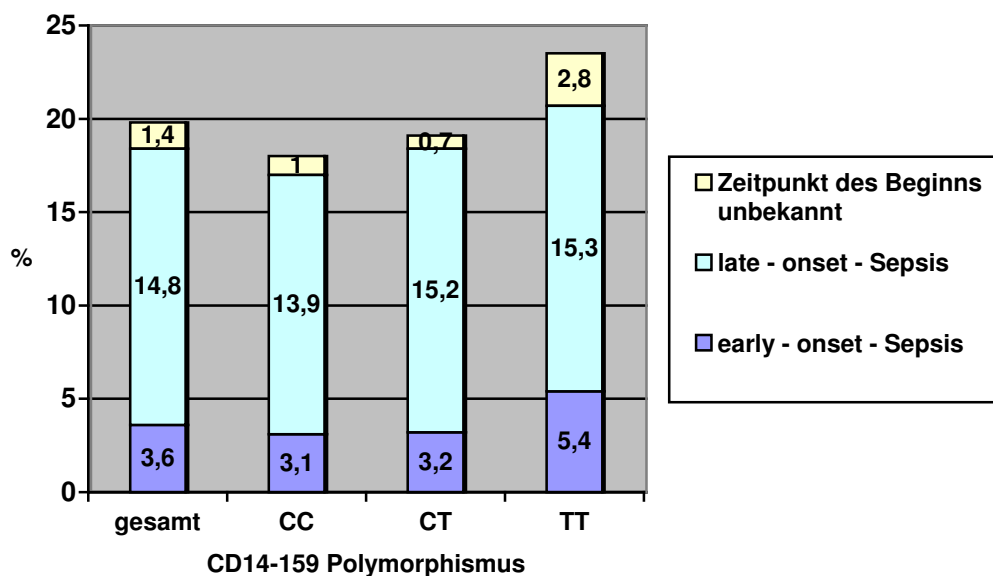


Abbildung 2: Sepsis bei Frühgeborenen in Abhängigkeit vom CD14-159 Polymorphismus

CD14-159 CC n=394; CD14-159 CT n=696; CD14-159 TT n= 306; p-Werte für Sepsis gesamt p= 0,074; Late-onset-Sepsis p=0,8; Early-onset-Sepsis p=0,078; berechnet jeweils CD14-159 CC oder CT vs. CD14-159 TT

Tabelle 8: Sepsis bei Frühgeborenen mit unterschiedlichem CD14-159 Genotyp

	Gesamt n=1396	CD14-159 CC n=394	CD14-159 CT n=696	CD14-159 TT n=306	p [#]
Gram-positive Sepsis [%] [§]	13,8	13,5	12,8	16,3	0,15
Gram-negative Sepsis [%] [§]	5,2	4,6	5,2	6,2	0,38
Operation wegen nekrotisierender Enterokolitis [%]	3,0	1,3	3,0	5,2	0,014
Tod [%]	2,9	2,8	2,6	3,6	0,4

[§] Candida-Sepsistiden und Infektionen mit anderen Erregern wurden aufgrund ihrer Seltenheit nicht ausgewertet, [#] CD14-159CC oder CT vs. CD14-159TT, Fisher's exact test für alle Parameter.

Wie die Abbildung 2 zeigt, bestätigte sich zwar der in Voruntersuchungen festgestellte Trend zu einer höheren Zahl von Sepsitiden mit positiver Blutkultur bei Frühgeborenen mit einem CD14-159 TT Genotyp, allerdings war dieser Unterschied trotz einer sehr hohen Anzahl an untersuchten Frühgeborenen nicht signifikant. Insbesondere für die late-onset-Sepsis zeigte sich kein erhöhtes Risiko für CD14-159 TT Allelträger. Interessant ist die in Tabelle 8 dargestellte Häufung von operationspflichtigen nekrotisierenden Enterokolitiden bei Frühgeborenen mit einem CD14-159 TT Genotyp und die Seltenheit dieser Erkrankung bei Frühgeborenen mit dem CD14-159 CC Genotyp, die sich auch nach Ausschluss von Mehrlingen nachweisen ließ (Tabelle 9). Diese Assoziation ist in der Literatur nicht vorbeschrieben und muss an einem 2. Kollektiv bestätigt werden.

Tabelle 9: Sepsis bei Frühgeborenen mit unterschiedlichem CD14-159 Genotyp (aus jeder Mehrlingsgruppe wurde nur ein Kind berücksichtigt)

	Gesamt n=1177	CD14-159CC n=337	CD14-159CT n=587	CD14-159TT n=253	p [#]
Sepsis mit positiver Blutkultur [%]	20,2	18,1	19,8	24,1	0,093
Late onset-Sepsis [%]*	15,5	14,1	16,2	15,6	1
Early-onset-Sepsis [%]*	3,5	3,0	2,8	5,7	0,046
Gram-positive Sepsis [%] [§]	13,8	13,6	12,8	16,6	0,15
Gram-negative Sepsis [%] [§]	5,2	4,5	5,3	5,9	0,52
Operation wegen nekrotisierender Enterokolitis [%]	3,1	1,5	2,9	5,5	0,021
Tod [%]	2,9	2,7	2,7	3,6	0,5

* In 1,2% der Sepsisfälle war der genaue Zeitpunkt des Beginns der Sepsis nicht dokumentiert worden

[§] Candida-Sepsistiden und Infektionen mit anderen Erregern wurden aufgrund ihrer Seltenheit nicht ausgewertet, [#] CD14-159 CC oder CT vs. CD14-159 TT, Fisher's exact test für alle Parameter.

Auch für den CARD15/NOD2-3020insC Polymorphismus ließen sich die Vorbefunde nicht bestätigen. Zwar ist auch bei Anlageträgern dieses Polymorphismus die Sepsisrate erhöht (siehe Abb. 3), das Ausmaß der Differenz ist jedoch weit geringer als aufgrund der publizierten Voruntersuchungen vermutet worden war. Im Gegensatz zum CD14-159 Polymorphismus ist die Differenz allerdings bezüglich des Endpunktes „late-onset-Sepsis“ besonders ausgeprägt. Der Ausschluss von Mehrlingen führt zu identischen Resultaten (Tabelle 11).

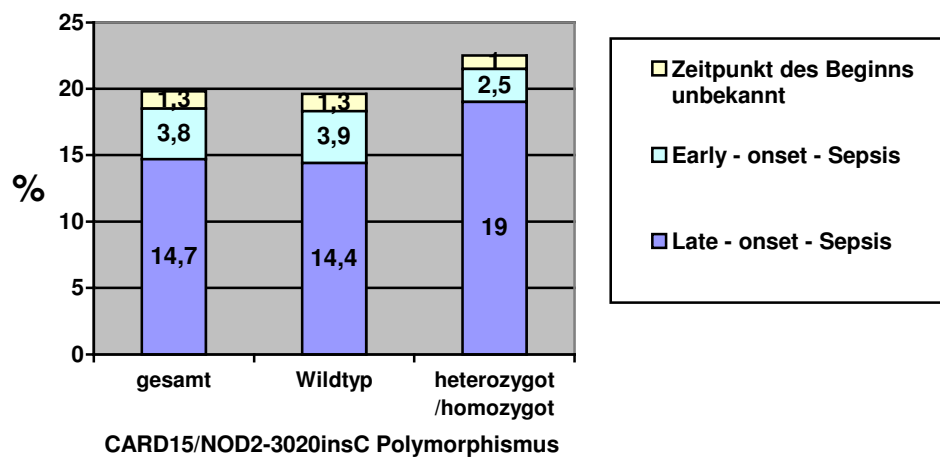


Abbildung 3: Sepsis bei Frühgeborenen in Abhängigkeit vom CARD15/NOD2-3020insC Polymorphismus

gesamt n=1416; Wildtyp n=1336; hetero/homozygot n=80, p – Werte für Sepsis gesamt p=0,5, Late – onset – Sepsis p=0,25; Early – onset – Sepsis p=0,76, berechnet CARD15/NOD2-3020-Wildtyp vs. CARD15/NOD2-3020-insC hetero- oder homozygot

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen nekrotisierender Enterokolitis und dem CARD/NOD2-3020insC Polymorphismus konnte hier ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 10: Sepsis bei Frühgeborenen mit unterschiedlichem CARD15/NOD2-3020insC Genotyp

	Gesamt n=1416	NOD2-3020insC Wildtyp n=1336	NOD2-3020insC hetero/homozygot n=80	p [#]
Gram-positive Sepsis [%] [§]	13,8	13,5	18,8	0,18
Gram-negative Sepsis [%] [§]	5,3	5,3	5,0	1
Operation wegen nekrotisierender Enterokolitis [%]	3,0	3,0	3,8	0,7
Tod [%]	3,0	3,1	1,3	0,5

[§] Candida-Sepsistiden und Infektionen mit anderen Erregern wurden aufgrund ihrer Seltenheit nicht ausgewertet, [#] CARD15/NOD2-3020 Wildtyp vs. CARD15/NOD2-3020insC hetero- oder homozygot, Fisher's exact test für alle Parameter.

Tabelle 11: Sepsis bei Frühgeborenen mit unterschiedlichem CARD15/NOD2-3020insC Genotyp (aus jeder Mehrlingsgruppe wurde nur ein Kind berücksichtigt)

	Gesamt n=1192	NOD2-3020insC Wildtyp n=1123	NOD2-3020insC hetero/homozygote n=69	p [#]
Sepsis mit positiver Blutkultur [%]	20,3	20,0	24,6	0,3
Late onset-Sepsis [%]*	15,3	15,0	20,6	0,22
Early-onset-Sepsis [%]*	3,7	3,7	2,9	1
Gram-positive Sepsis [%] [§]	13,9	13,5	20,3	0,14
Gram-negative Sepsis [%] [§]	5,3	5,3	5,8	0,7
Operation wegen nekrotisierender Enterokolitis [%]	3,1	3,1	2,9	1
Tod [%]	3,0	3,1	1,4	0,7

* In 1,3% der Sepsisfälle war der genaue Zeitpunkt des Beginns der Sepsis nicht dokumentiert worden.

[§] Candida-Sepsitiden und Infektionen mit anderen Erregern wurden aufgrund ihrer Seltenheit nicht ausgewertet, [#] CARD15/NOD2-3020 Wildtyp vs. CARD15/NOD2-3020insC hetero- oder homozygot, Fisher's exact test für alle Parameter.

In Anbetracht der Vorstellung, dass sich eine hohe Infektanfälligkeit eher in der Anzahl der Sepsitiden niederschlägt und darum in den vorangegangenen Tabellen nicht erfasst worden ist, analysierten wir zusätzlich den Zusammenhang zwischen mehrfachen Sepsitiden und dem kindlichen Genotyp. Auch wenn hier eine Tendenz zu erkennen ist, sind die Werte statistisch nicht signifikant (siehe Abb. 4).

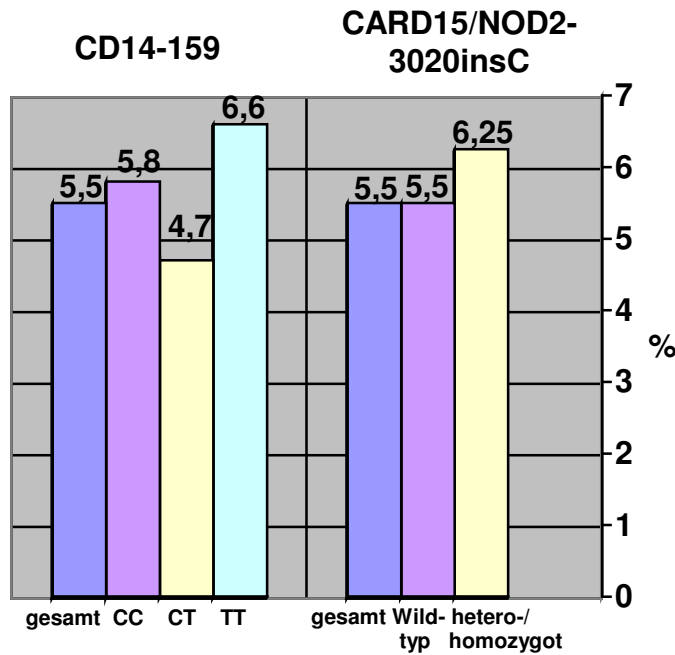


Abbildung 4: mehr als eine Sepsis bei Frühgeborenen in Abhängigkeit vom CD14-159 und CARD15/NOD2-3020insC Polymorphismus

CD14-159 gesamt n=1393, CC n=394, CT n=696, TT n=303; CARD15/NOD2-3020insC gesamt n=1413, Wildtyp n=1333, hetero-/homozygot n=80, CD14-159 CC oder CT vs. CD14-159 TT p=0,319, CARD15/NOD2-3020insC Wildtyp vs. CARD15/NOD2-3020insC hetero- oder homozygot p=0,799

3.4. Behandlungsdaten

Für die folgenden Auswertungen wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die Daten nach Einschluss jeweils eines Kindes aus jeder Mehrlingsgruppe berücksichtigt. Tabelle 12 und 13 zeigen die Therapiedaten der Frühgeborenen in Abhängigkeit vom CD14-159 bzw. CARD15/NOD2-3020insC Genotyp. Da die übergroße Mehrzahl von Frühgeborenen mit Antibiotika behandelt wurde, prüften wir durch Einzelauswertungen nur Reserveantibiotika (Teicoplanin, Vancomycin, Imipenem, Meropenem) und Antibiotika für ungewöhnliche Erreger (Metronidazol, Erythromycin).

Tabelle 12: Behandlungsdaten von Frühgeborenen mit unterschiedlichem CD14-159 Genotyp (aus jeder Mehrlingsgruppe wurde nur ein Kind berücksichtigt)

	Gesamt n=1177	CD14-159 CC n=337	CD14-159 CT n=587	CD14-159 TT n=253	p [#]
Antibiotika [%]	84,6	82,51	85	86,6	0,37
Vancomycin [%]	32,8	30,3	32,2	37,5	0,07
Teicoplanin [%]	3,8	1,8	4,8	4,3	0,5
Imipenem [%]	7,2	7,1	6,6	8,7	0,3
Meropenem [%]	10,8	9,8	11,1	11,5	0,7
Erythromycin [%]	6,1	7,4	5,8	5,1	0,5
Metronidazol[%]	6,5	5,0	6,3	8,7	0,1
Katecholamine [%]	20,6	17,5	22,0	21,7	0,6
Analgetika und Sedativa [%]	34,1	30,9	35,8	34,7	0,8
Surfactant [%]	44,4	39,8	45,5	48	0,19
Diuretika [%]	30,2	25,8	30,7	35,2	0,064
Zentralvenöse Katheter [%]	40,7	38,3	41,1	42,9	0,4
Beatmung [%]	45,7	42,7	47	46,6	0,7

[#] CD14-159 CC oder CT vs. CD14-159 TT, Fisher's exact test für alle Parameter.

Weder für den CD14-159 CT Polymorphismus noch für den CARD15/NOD2-3020insC Genotyp (Tabelle 13) fanden sich Unterschiede bezüglich der Behandlungsdaten der Frühgeborenen. Zwar wurden bei den Genotypen, für die ein erhöhtes Sepsisrisiko vermutet worden war (CD14-159 T bzw. CARD15/NOD2-3020insC), häufiger Vancomycin als Reserveantibiotikum für Gram-positive Infektionen eingesetzt, diese Differenzen waren aber statistisch nicht signifikant.

Tabelle 13: Behandlungsdaten von Frühgeborenen mit unterschiedlichem CARD15/NOD2-3020insC Genotyp (aus jeder Mehrlingsgruppe wurde nur ein Kind berücksichtigt)

	Gesamt n=1192	NOD2-3020insC Wildtyp n=1123	NOD2-3020insC hetero/homozygot n=69	p [#]
Antibiotika [%]	84,7	84,9	82,6	0,6
Vancomycin [%]	32,6	32,1	42,0	0,11
Teicoplanin [%]	3,8	3,9	1,4	0,5
Imipenem [%]	7,4	7,4	7,2	1
Meropenem [%]	11	10,8	14,5	0,3
Erythromycin [%]	6,0	5,7	11,6	0,06
Metronidazol [%]	6,5	6,3	10,1	0,2
Katecholamine [%]	20,3	20,1	23,2	0,5
Analgetika und Sedativa [%]	34,4	34,2	38,2	0,5
Surfactant [%]	44,2	44,0	46,4	0,7
Diuretika [%]	29,8	29,8	29,0	1
Zentralvenöse Katheter [%]	40,6	40,5	42	0,8
Beatmung [%]	45,9	45,7	49,3	0,6

[#] CARD15/NOD2-3020 Wildtyp vs. CARD15/NOD2-3020insC hetero- oder homozygot, Fisher's exact test für alle Parameter.

3.5. Weitere Erkrankungen Frühgeborener (außer Sepsis)

Da Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht unter 1500 Gramm eine erhebliche Morbidität für eine Reihe von frühgeborenen-spezifischen Erkrankungen aufweisen, werden diese in den folgenden Tabellen zusammengefasst. Erneut wurde nur jeweils ein Mehrling pro Mehrlingsgruppe analysiert.

Für den CD14-159 TT Genotyp zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede, wenn die fokale intestinale Perforation und die nekrotisierende Enterokolitis kombiniert analysiert wurden. Ferner fiel eine relativ geringe Häufigkeit von Hirnblutungen bei Frühgeborenen mit einem CD14-159 CC Genotyp auf. Für den CARD15/NOD2-3020insC Genotyp zeigten sich außer einer Häufung von operativen Ligaturen eines PDA keine statistischen Differenzen bezüglich der untersuchten Erkrankungen.

Tabelle 14: Weitere Erkrankungen (außer Sepsis) von Frühgeborenen mit unterschiedlichem CD14-159 Genotyp (aus jeder Mehrlingsgruppe wurde nur ein Kind berücksichtigt)

	Gesamt n=1177	CD14-159CC n=337	CD14-159CT n=587	CD14-159TT n=253	p [#]
Hirnblutung [%]	18,5	14,9	19,8	20,2	0,4
Grad I [%]	7,4	6,0	7,2	9,9	
Grad II [%]	3,8	3,9	4,4	2,4	
Grad III [%]	3,2	2,4	3,4	4,0	
Grad IV [%]	3,9	2,7	4,6	4,0	
Periventriculäre Leukomalazie [%]	4,1	3,6	4,9	2,8	0,2
Bronchopulmonale Dysplasie [%]	14,9	12,8	15,6	16,1	0,5
Ligatur eines PDA* [%]	5,9	5,6	5,1	7,9	0,1
Laserung der Retina bei ROP ^{&} [%]	3,5	2,4	3,2	5,6	0,052
Operation bei fokaler intestinaler Perforation (FIP) [%]	2,0	1,2	1,7	3,6	0,067
Operation bei FIP oder NEC [%]	4,3	2,1	4,4	7,1	0,022

* Persistierender Ductus arteriosus, & Retinopathie des Frühgeborenen, [#] CD14-159CC oder CT vs. CD14-159TT, Fisher's exact test für alle Parameter.

Tabelle 15: Weitere Erkrankungen (außer Sepsis) von Frühgeborenen mit unterschiedlichem CARD15/NOD2-3020insC Genotyp (aus jeder Mehrlingsgruppe wurde nur ein Kind berücksichtigt)

	Gesamt n=1192	NOD2-3020insC Wildtyp n=1123	NOD2-3020insC hetero-/homozygot n=69	p [#]
Hirnblutung [%]	18,7	18,9	15,9	0,6
Grad I [%]	7,6	7,7	5,8	
Grad II [%]	3,8	4,0	0	
Grad III [%]	3,4	3,2	5,8	
Grad IV [%]	3,9	3,9	4,3	
Periventrikuläre Leukomalazie [%]	4,1	4,1	4,3	0,7
Bronchopulmonale Dysplasie [%]	14,9	14,9	15,2	1
Ligatur eines PDA* [%]	6,0	5,5	13,0	0,018
Laserung der Retina bei ROP ^{&} [%]	3,5	3,5	4,3	0,7
Operation bei fokaler intestinaler Perforation (FIP) [%]	1,9	1,9	2,9	0,3
Operation bei FIP oder NEC [%]	4,4	4,3	5,8	0,5

* Persistierender Ductus arteriosus, [&] Retinopathie des Frühgeborenen, [#] CARD15/NOD2-3020 Wildtyp vs. CARD15/NOD2-3020-insC hetero- oder homozygot, Fisher's exact test für alle Parameter.

3.6. Analysen von Subgruppen mit besonders hohem Infektionsrisiko

Um auszuschließen, dass die oben beschriebenen geringen Differenzen bezüglich des Auftretens einer Sepsis auf die große Anzahl von Kindern zurückzuführen sind, die keine Sepsis während des stationären Aufenthaltes entwickelten, analysierten wir exemplarisch drei Subgruppen von Frühgeborenen mit besonders hohem Sepsisrisiko: Kinder mit zentralvenösen Kathetern, Kinder mit einem Geburtsgewicht unter 1000 Gramm und Kinder mit einem Gestationsalter unter 28 Schwangerschaftswochen. Einschränkend ist zu bemerken, dass zwischen diesen Gruppen große Überschneidungen bestehen. In Tabelle 16 sind zunächst die Daten bezüglich des CD14-159 T Genotyps dargestellt:

Tabelle 16: Analyse von Subgruppen mit besonders hohem Infektionsrisiko mit unterschiedlichem CD14-159 Genotyp (aus jeder Mehrlingsgruppe wurde nur ein Kind berücksichtigt)

	Gesamt	CD14-159 CC	CD14-159 CT	CD14-159 TT	p [#]
Frühgeborene mit ZVK [n]	478	129	241	108	
Frühgeborene mit ZVK und Sepsis mit positiver Blutkultur [%]	34,1	33,3	31,1	41,7	0,065
Frühgeborene < 28 SSW* [n]	434	111	218	105	
Frühgeborene < 28 SSW und Sepsis mit positiver Blutkultur [%]	33,6	34,2	32,6	35,2	0,7
Frühgeborene < 1000 g [n]	492	132	252	108	
Frühgeborene < 1000 g und Sepsis mit positiver Blutkultur [%]	32,7	32,6	29,4	40,7	0,049

* Schwangerschaftswochen, [#] CD14-159 CC oder CT vs. CD14-159 TT, Fisher's exact test für alle Parameter.

Signifikante Unterschiede finden sich lediglich für die Subgruppe der Kinder mit einem Geburtsgewicht unter 1000 Gramm. Allerdings sind diese Unterschiede nicht mehr nachweisbar, wenn man die für den klinisch tätigen Arzt besonders interessanten late-onset-Sepsistiden auswertet. Die Häufigkeit der late-onset-Sepsis bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1000 Gramm und dem CD14-159 CC/CT Genotyp beträgt 25,3% vs. 28,4% bei Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1000 Gramm und dem CD14-159 TT Genotyp (p nicht signifikant).

Tabelle 17 zeigt die identischen Risikogruppen für die CARD15/NOD2-3020insC Genotypen.

Tabelle 17: Analyse von Subgruppen mit besonders hohem Infektionsrisiko mit unterschiedlichem CARD15/NOD2-3020insC Genotyp (aus jeder Mehrlingsgruppe wurde nur ein Kind berücksichtigt)

	Gesamt	NOD2-3020insC Wildtyp	NOD2-3020insC hetero/homozygot	p [#]
Frühgeborene mit ZVK [n]	483	454	29	
Frühgeborene mit ZVK und Sepsis mit positiver Blutkultur [%]	34,4	33,9	41,4	0,4
Frühgeborene < 28 SSW* [n]	438	412	26	
Frühgeborene < 28 SSW und Sepsis mit positiver Blutkultur [%]	33,8	34	30,8	0,8
Frühgeborene < 1000 g [n]	499	473	26	
Frühgeborene < 1000 g und Sepsis mit positiver Blutkultur [%]	32,9	32,6	38,5	0,5

* Schwangerschaftswochen, [#] CARD15/NOD2-3020-Wildtyp vs. CARD15/NOD2-3020insC hetero- oder homozygot, Fisher's exact test für alle Parameter.

Die Tabelle zeigt, dass auch Frühgeborene, die Anlageträger des CARD15/NOD2-3020insC Genotyps sind und bei denen zusätzliche klinische Risikofaktoren vorliegen, keine erhöhte Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung einer Sepsis mit positiver Blutkultur haben.

IV. Diskussion

4.1. Generelle Aspekte zur Bewertung genetischer Assoziationsstudien

Genetische Assoziationsstudien werden seit Durchführung des Human Genome Projects in großer Zahl veröffentlicht. Wie schon in der Einleitung angedeutet, widersprechen sich diese häufig im Hinblick auf ihre Ergebnisse und die daraus gezogenen Schlussfolgerungen. Dieses Grundsatzproblem veranlasste die Zeitschrift „Nature Genetics“ im Mai 1999 zu einem generellen Statement zur Publizierung solcher Arbeiten. Die Autoren stellten klar, dass Studien mit großen Fallzahlen, klar nachvollziehbarer Statistik, biologisch sinnvollen Hypothesen sowie im Fall einer nachgewiesenen Assoziation hoch signifikanten p-Werten von großer Wichtigkeit für den Fortschritt der Forschung seien. Allerdings seien aufgrund der schon beschriebenen Problematik die Anforderungen an eine solche sehr hoch anzulegen.

Im Jahr 2005 veröffentlichten Vitali et al. Kriterien zur Durchführung von Assoziationsstudien bei Sepsis. Sie stellten eine eindeutige Liste von Anforderungen an solche Studien auf. Deren Erfüllung soll unter anderem in der folgenden Diskussion kritisch bewertet werden.

4.2.1. Studienpopulation

Mit 1465 Frühgeborenen unter 1500g, von denen 19,8% eine Sepsis entwickelten, weist diese Studie eine überdurchschnittlich große Studienpopulation auf. So ergab eine systematische Untersuchung zur Qualität von Assoziationsstudien bei Sepsis, dass zwischen 1996 und 2005

nur fünf Studien mehr als 300 septische Patienten eingeschlossen hatten (Clark und Baudouin 2006).

Dennoch kann ein möglicher Einfluss durch negative Selektion durch die Nichtaufnahme der frühzeitig Gestorbenen nicht ausgeschlossen werden. So kann zum Beispiel der Tod vor Ausprägung der Hirnblutung eingetreten sein, was die Vergleichbarkeit der Populationen in Bezug auf diese Variable in Frage stellen würde.

Zu erwähnen ist hier auch, dass ein Großteil (74%) der eingeschlossenen Kinder deutscher Abstammung ist. Aufgrund der zu geringen Einschussrate von Kindern anderer ethnischer Abstammung lässt sich an dieser Stelle keine definitive Aussage über die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf diese treffen. Aufgrund der nachgewiesenen hohen genetischen Variabilität einzelner ethnischer Gruppen in Bezug auf die untersuchten Polymorphismen (Ito et al. 2000, The Wellcome Trust Case Control Consortium 2007, Lin et al. 2007) scheint es jedoch generell sinnvoller zu sein, sich nur auf Aussagen zu einer ethnischen Gruppe zu beschränken (Vitali et al. 2005, Clark und Baudouin 2007).

4.2.2. Verblindung der Studie

Vitali et al. fordern in ihrem Artikel sowohl eine Verblindung des Laborpersonals gegenüber den klinischen Daten wie auch des klinischen Personals gegenüber dem Genotyp. Dieses Kriterium ist in dieser Studie voll erfüllt, da eine Zuordnung der genetischen und klinischen Befunde erst stattfand, wenn sowohl die Bestimmung des Polymorphismus als auch die Eingabe der Daten vollständig war.

4.2.3. Reproduzierbarkeit

Die Datenerhebung und die Genotypisierung waren einerseits durch eindeutige, den standardisierten Neonatalerhebungsbögen angegliche Formulare wie andererseits durch im Labor etablierte und standardisierte Verfahren jederzeit voll nachvollziehbar und reproduzierbar. Durch das Monitoring, die doppelte Eingabe der Daten und regelmäßige Qualitätskontrollen durch Doppelbestimmungen im Labor wurde eine gute Reproduzierbarkeit zusätzlich gewährleistet.

Aufgrund zum Teil erheblich unterschiedlicher Therapieregime an den teilnehmenden Kliniken kann jedoch ein unbekannter und nicht erfasster Einflussfaktor nie ganz ausgeschlossen werden.

4.3. Polymorphismen des Immunsystems bei Frühgeborenen

Wie im Ergebnisteil dargestellt, konnte die Hypothese der Arbeit, dass der CD14-159 TT Genotyp bzw. der CARD15/NOD2-3020insC Genotyp mit einer erhöhten Sepsisrate bei Frühgeborenen assoziiert ist, nicht bestätigt werden. Zwar wiesen Frühgeborene, die einen der beiden Genotypen tragen, eine höhere Sepsisrate auf, die Differenz zu Anlageträgern des Wildtyp-Allels war jedoch weitaus geringer als angenommen. Da die zusätzlichen Analysen eine Reihe zusätzlicher Aspekte ergaben, werden im Folgenden die Ergebnisse in Bezug auf beide Polymorphismen getrennt diskutiert.

4.3.1. CD14-159 Polymorphismus

Die funktionellen Daten zu den Auswirkungen des CD14-159 Polymorphismus sind widersprüchlich. Während einige Autoren einen Einfluss des Polymorphismus auf die löslichen CD14-Spiegel beschreiben (Hubacek 1999, Baldini 1999), konnten andere diese Daten nicht bestätigen (Heesen 2001, 2002). In einer kürzlich erschienenen Arbeit, die mit LPS-stimulierten Vollblutkulturen arbeitete, wurden eine hohe TNF- α und IL6-Produktion und eine niedrige IL10-Freisetzung bei CD14-159 TT Anlageträgern beobachtet (Lin 2007). Dies würde für eine ausgeprägtere Entzündungsreaktion von CD14-159 TT Anlageträgern sprechen.

Bislang wurden zwei Arbeiten zur Assoziation einer Frühgeborenensepsis mit dem CD14-159 C/T Polymorphismus publiziert. Ahrens et al. beschrieben eine (nicht signifikante) Häufung von Sepsitiden mit positiver Blutkultur bei Patienten mit einem homozygoten CD14-159 TT Genotyp (Ahrens 2004). In dieser Arbeit wurde der Zeitpunkt des Auftretens der Sepsis nicht erhoben. Baier et al. untersuchten die Assoziation des CD14-159 C/T Polymorphismus mit dem Auftreten von neonatalen Sepsitiden bei 293 beatmeten Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1500 Gramm. Die Gesamthäufigkeit von Sepsitiden unterschied sich nicht signifikant zwischen Frühgeborenen mit unterschiedlichen Genotypen, allerdings traten mehrfache Sepsitiden bei CD14-159 TT Anlageträgern häufiger auf (CC 17%, CT 11%, TT 30%, $p=0,022$, Baier 2006). Dies konnten wir jedoch in dieser Studie nicht bestätigen.

In der vorliegenden Arbeit beobachteten wir einen Trend zu vermehrten Sepsitiden bei Anlageträgern des CD14-159 TT Genotyps, allerdings war dies auf den häufigeren Erregernachweis bei early-onset-Sepsitiden zurückzuführen. Dazu passend kommen diese Frühgeborenen überzufällig häufig aufgrund unhemmbarer Wehen zur Welt und ihre Mütter werden überzufällig häufig mit Tokolytika behandelt. Vergleichbare Daten wurden von Kalish et al. publiziert, die eine Neigung zu einem vorzeitigen

Blasensprung bei Mehrlingsmüttern beschrieb, die homozygot für den CD14-159 T Polymorphismus waren (Kalisch et al. 2006).

Wiederum könnte dies mit der Wechselbeziehung der Immunsysteme erklärt werden. Hypothetisch könnte aus den vorliegenden Studien angenommen werden, dass ein den TT Genotyp aufweisende Kind auf jede Form der Infektion heftiger reagiert als ein Kind mit dem CC Genotyp. Dass Infektionen per se eine Geburt auslösen können, ist gemeinhin bekannt (Goldenberg und Rouse 1998, Vogel et al. 2005). Im Umkehrschluss könnte man also annehmen, dass eine stärkere Immunreaktion wahrscheinlicher eine Geburt auslösen könnte, während Kinder mit dem CC Genotyp bei gleicher Pathogenexposition nicht so stark reagierten, wodurch die Schwangerschaft bestehen bliebe. Gegen dieses Modell spricht in diesem Zusammenhang allerdings die Beobachtung, dass Patienten mit dem CT Genotyp die niedrigste Tokolyserate aufweisen.

Diese Hypothese ist im Endeffekt generell sicherlich sehr schwer beleg- und widerlegbar, da es dazu nötig wäre, vor der Geburt den Polymorphismus des Kindes zu bestimmen und dann begleitend den Verlauf von Infektionen zu beobachten. Möglich wäre dies nur im Zusammenhang mit Amniozentesen oder Nabelschnurblutentnahmen. Bezüglich der den Zusammenhang zwischen CD14-159 T und Sepsis bei Erwachsenen betreffenden Studienlage herrscht - wie in der Einleitung beschrieben - keine große Einigkeit. So konnten mehrere Studien einen entsprechenden Zusammenhang nicht herstellen (Hubacek et al. 2000, Agnese et al. 2002, Sutherland et al. 2005). In dieser Studie ist bei Frühgeborenen ebenfalls kein Zusammenhang bewiesen worden, was allerdings auch damit erklärt werden könnte, dass die meisten neonatalen Septitiden auf Gram-positive Erreger zurückzuführen sind (Ahrens et al. 2004).

Für die late-onset-Sepsis des Frühgeborenen beobachteten wir keine Häufung bei CD14-159 TT Anlageträgern. Allerdings bestand in unserem Kollektiv eine Assoziation zwischen dem CD14-159 TT Polymorphismus und dem Auftreten einer operationspflichtigen nekrotisierenden Enterokolitis. In

der einzigen Publikation zu diesem Thema fanden die Autoren keinen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer nekrotisierenden Enterokolitis und dem CD14-159 C/T Polymorphismus. Allerdings wurden in dieser Studie nur 118 Frühgeborene mit einem Geburtsgewicht unter 1500 Gramm untersucht, von denen lediglich 8 eine nekrotisierende Enterokolitis, Stadium 3 nach Bell, entwickelten (ein Schweregrad, der in der Regel zu einem operativen Vorgehen führt, Szebeni 2006). Im Gegensatz dazu wurden im Rahmen der vorliegenden Studie 1396 Frühgeborene untersucht, von denen 42 eine operationspflichtige nekrotisierende Enterokolitis entwickelten. Da dies immer noch eine relativ geringe Zahl an betroffenen Kindern ist, wäre eine entsprechende Untersuchung an einem zweiten Kollektiv sicherlich sinnvoll. Ein Zusammenhang zwischen früher Entzündung und IVH wurde auch 1999 von Leviton et al. postuliert. Interessant ist in diesem Zusammenhang unsere Beobachtung, dass Frühgeborene mit einem CD14-159 CC Genotyp seltener Hirnblutungen erleiden als Frühgeborene, die heterozygot oder homozygot für den CD14-159 T Polymorphismus sind.

Wie in der Einleitung erwähnt, führt der CD14-159 T Polymorphismus zu höheren CD14 – Spiegeln im Blut (LeVan et al. 2001, Kabesch et al. 2004). Dies gilt auch ohne, aber vor allem mit LPS als Stimulus. Drei frühere Studien, die diesen Zusammenhang nicht nachweisen konnten, schlossen je entweder weniger als 100 Patienten ein oder wurden an anderen ethnischen Gruppen durchgeführt (Ito et al. 2000, Heesen et al. 2001 , Heesen et al. 2002).

Wird also ein Kind, das den oben genannten Polymorphismus trägt, schon im Mutterleib einem infektiösen Agens - zum Beispiel LPS - ausgesetzt, würde es folglich mit einer stärkeren Immunreaktion beziehungsweise mit höheren TNF- α -Spiegeln (Kabesch et al. 2004) reagieren als Kinder mit einem CD14-159 C Polymorphismus. Da besonders bei Frühgeborenen die Blut-Hirn-Schranke noch nicht vollständig ausgeprägt ist (Dammann 1999), gelangt LPS auch ins zentrale Nervensystem, beziehungsweise bei älteren Kindern zuerst in die besonders gut durchbluteten, zirkumventrikulären Organe

(Lacroix et al. 1998). Die Insuffizienz der Blut-Hirn-Schranke würde auch den oben erwähnten Zusammenhang zwischen Gestationsalter und IVH erklären. Da dort besonders TLR4 und CD14 stark vertreten sind (Lacroix et al. 1998, Laflamme et al. 2001), kommt es zu einer starken Entzündungsreaktion (Dammann 1999), infolge derer eine Gehirnläsion entstehen könnte (Dammann 1999). Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass Blutungen zuerst im Umkreis von Ventrikeln auftreten. Darüber hinaus wäre die Wahrscheinlichkeit für eine Hirnschädigung hier ebenfalls erhöht (Lehnardt et al. 2003).

2003 konnten Linder et al. den Zusammenhang zwischen einer frühen Sepsis und IVH beschreiben. Diese Studie nimmt jedoch keinen Bezug auf den CD14 Genotyp.

4.3.2. *CARD15/NOD2-3020insC*

Sowohl die funktionelle Relevanz als auch die in vielen Studien belegte Assoziation des *CARD15/NOD2-3020insC* Polymorphismus mit dem Auftreten eines M. Crohn ist unstrittig. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang eine kürzlich publizierte Arbeit zur Überlebensrate von Patienten nach HLA-identischer Knochenmarkstransplantation in Abhängigkeit vom *CARD15/NOD2-3020insC* Polymorphismus-Status des Spenders und Empfängers. Wenn Spender und oder Empfänger einen *CARD15/NOD2-3020insC* Polymorphismus trugen, so war die Überlebensrate deutlich erhöht. Wenn allerdings die Empfänger einer kombinierten Darmdekontamination gegen Gram-positive und Gram-negative Erreger unterzogen wurden, so war die Mortalität nicht erhöht (Holler 2006). Diese Studie weist in exemplarischer Weise die Interaktion von Wirts- und Umgebungsfaktoren nach, die bei gegebener Disposition zur Erkrankung führen können.

Allerdings zeigten sich bei den von uns untersuchten 80 Frühgeborenen, die heterozygote bzw. homozygote Anlageträger des CARD15/NOD2-3020insC Polymorphismus sind, – abgesehen von einer Häufung eines operativen Ductusverschlusses – keinerlei Auffälligkeiten. Unter Umständen ist die von uns untersuchte Anzahl an CARD15/NOD2-3020insC Anlageträgern zu gering, als dass man minimale Effekte detektieren könnte, aber auch eine selektive Untersuchung von Kindern mit zusätzlichen Risikofaktoren (im Sinne des oben beschriebenen Modells) ergab sich keine besondere Empfindlichkeit CARD15/NOD2-3020insC positiver Frühgeborener für die Entwicklung von Infektionen. Möglicherweise spielt hier auch die besondere Darmflora von Früh- und Neugeborenen eine Rolle, die die bei Erwachsenen beobachteten Assoziationen aufgrund einer nicht gegebenen Erregerexposition nicht wirksam werden lässt.

Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von NEC und dem CARD15/NOD2-3020insC Polymorphismus, der aufgrund des bewiesenen Zusammenhanges dieses Genotyps mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nahe liegen würde, konnte bei uns wie in der vorliegenden Literatur nicht nachgewiesen werden (Habib et al. 2005).

4.4. Schlussfolgerungen und kurzer Ausblick

Obwohl wir unsere Ausgangshypothese nicht verifizieren konnten, ergab unsere Untersuchung eine Vielzahl neuer Informationen bezüglich des CD14-159 C/T und des CARD15/NOD2-3020insC Polymorphismus. Besonders interessant ist dabei die von uns beobachtete Assoziation des CD14-159 T Polymorphismus mit einer gehäuften Anwendung von Tokolytika, einer gehäuften Geburt aufgrund unhemmbarer Wehen und dem häufigen Nachweis von early-onset-Sepsitiden bei den betroffenen Frühgeborenen. All dies legt eine besondere Empfänglichkeit von CD14-159

T homozygoten Feten für intrauterine Infektionen nahe. Ob dem maternalen CD14-Genotyp in diesem Zusammenhang eine zusätzliche Bedeutung zukommt oder ob der maternale Genotyp die eigentlich entscheidende Determinante für die von uns beobachtete Assoziation ist, wird zur Zeit untersucht. Sollten sich diese Befunde bestätigen, so könnte bei betroffenen Frühgeborenen eine immunmodulierende Therapie unter Umständen die negativen Effekte der frühen Entzündungsreaktion reduzieren. Auch die Häufung von operationspflichtigen nekrotisierenden Enterokolitiden wirft die Frage auf, ob bei Anlageträgern der CD14-159 T Polymorphismus eine immunmodulierende Rolle spielt, die möglicherweise auch zu einer besonderen Empfindlichkeit für diese schwere Erkrankung des Frühgeborenen führt. Wie die anderen von uns im Rahmen dieser Studie beschriebenen Assoziationen muss aber auch diese Beobachtung durch die Untersuchung eines zweiten unabhängigen Kollektivs bestätigt werden, bevor von dem Vorliegen einer echten Assoziation ausgegangen werden kann.

Es werden also noch einige Anschlussstudien nötig sein, um einerseits die hier vorliegenden Ergebnisse zu bestätigen und andererseits mögliche Konsequenzen in Therapie und Diagnostik zu etablieren.

V. Zusammenfassung

Das angeborene Immunsystem stellt bei Neugeborenen den wichtigsten Schutz gegen Pathogene dar. Gerade Frühgeborene unter 1500 g bilden ein stark gefährdetes Kollektiv für Infektionen und daraus resultierende Sepsitiden. Ziel dieser Arbeit war es, einen Zusammenhang zwischen zwei Polymorphismen des Immunsystems CD14-159 und CARD15/NOD2-3020insC, die in vorangegangenen Studien eine Assoziation mit Sepsis gezeigt hatten, und dem Outcome dieser Kinder nachzuweisen.

Zu diesem Zweck schlossen wir zwischen September 2003 und Mai 2007 1465 Frühgeborene unter 1500g aus 13 deutschen neonatalen Intensivstationen in unsere Studie ein. Anhand standardisierter Erhebungsbögen erfolgte die Erfassung der klinischen Daten zu den Umständen der Geburt, dem Verlauf und der daraus resultierenden Behandlung. Des Weiteren wurden DNA-Proben der Kinder und der Mütter in unserem Labor mittels PCR auf den Genotyp bezüglich der oben genannten Polymorphismen untersucht.

In unserer Studie konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem CD14-159 oder dem CARD15/NOD2-3020insC Polymorphismus und dem Auftreten von Sepsitiden nachgewiesen werden. Auffällig war jedoch eine erstmals erfasste Häufung von nekrotisierenden Enterokolitiden im Zusammenhang mit dem CD14-159 TT Polymorphismus. Ferner zeigte sich eine Assoziation zwischen dem CD14-159 CC Polymorphismus und dem seltenen Auftreten von Hirnblutungen.

Unsere Ergebnisse legten eine generelle Neigung von CD14-159 TT Allelträgern zu intrauterinen Infektionen nahe. Auch wenn die Ausgangshypothese nicht bestätigt werden konnte, liefert diese Arbeit doch eine Vielzahl neuer Informationen bezüglich weiterer möglicher Zusammenhänge zwischen den genannten Polymorphismen und dem klinischen Verlauf von Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht unter 1500g.

VI. Literaturverzeichnis

- 1 Aderem, A. and Ulevitch, R. J., Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406 (6797), 782 (2000).
- 2 Agnese, D. M. et al., Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis* 186 (10), 1522 (2002).
- 3 Ahrens, P. et al., Mutations of genes involved in the innate immune system as predictors of sepsis in very low birth weight infants. *Pediatr Res* 55 (4), 652 (2004).
- 4 Alberti, C. et al., Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med* 28 (2), 108 (2002).
- 5 Arbour, N. C. et al., TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 25 (2), 187 (2000).
- 6 Arcaroli, J., Fessler, M. B., and Abraham, E., Genetic polymorphisms and sepsis. *Shock* 24 (4), 300 (2005).
- 7 Baier, R. J., Loggins, J., and Yanamandra, K., IL-10, IL-6 and CD14 polymorphisms and sepsis outcome in ventilated very low birth weight infants. *BMC Med* 4, 10 (2006).
- 8 Baldini, M. et al., A Polymorphism* in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20 (5), 976 (1999).
- 9 Brenmoehl, J. et al., Genetic variants in the NOD2/CARD15 gene are associated with early mortality in sepsis patients. *Intensive Care Med* (2007).
- 10 Clark, M. F. and Baudouin, S. V., A systematic review of the quality of genetic association studies in human sepsis. *Intensive Care Med* 32 (11), 1706 (2006).

- 11 Cohen, J., The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420 (6917), 885 (2002).
- 12 Consortium, The Wellcome Trust Case Control, Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447 (7145), 661 (2007).
- 13 Dahmer, M. K., Randolph, A., Vitali, S., and Quasney, M. W., Genetic polymorphisms in sepsis. *Pediatr Crit Care Med* 6 (3 Suppl), S61 (2005).
- 14 Dammann, O. and Leviton, A., Brain damage in preterm newborns: might enhancement of developmentally regulated endogenous protection open a door for prevention? *Pediatrics* 104 (3 Pt 1), 541 (1999).
- 15 Devitt, A. et al., Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392 (6675), 505 (1998).
- 16 Dziarski, R., Recognition of bacterial peptidoglycan by the innate immune system. *Cell Mol Life Sci* 60 (9), 1793 (2003).
- 17 Dziarski, R., Tapping, R. I., and Tobias, P. S., Binding of bacterial peptidoglycan to CD14. *J Biol Chem* 273 (15), 8680 (1998).
- 18 Frey, E. A. et al., Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med* 176 (6), 1665 (1992).
- 19 Gibot, S. et al., Association between a genomic polymorphism within the CD14 locus and septic shock susceptibility and mortality rate. *Crit Care Med* 30 (5), 969 (2002).
- 20 Goldenberg, R. L. and Rouse, D. J., Prevention of premature birth. *N Engl J Med* 339 (5), 313 (1998).
- 21 Goyert, S. M. et al., The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors. *Science* 239 (4839), 497 (1988).
- 22 Habib, Z. et al., CARD15/NOD2 is not a predisposing factor for necrotizing enterocolitis. *Dig Dis Sci* 50 (9), 1684 (2005).

- 23 Hailman, E. et al., Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med* 179 (1), 269 (1994).
- 24 Hartel, Ch et al., Polymorphisms of genes involved in innate immunity: association with preterm delivery. *Mol Hum Reprod* 10 (12), 911 (2004).
- 25 Haziot, A. et al., The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J Immunol* 141 (2), 547 (1988).
- 26 Heesen, M. et al., The -260 C-->T promoter polymorphism of the lipopolysaccharide receptor CD14 and severe sepsis in trauma patients. *Intensive Care Med* 28 (8), 1161 (2002).
- 27 Heesen, M. et al., Lack of association between the -260 C-->T promoter polymorphism of the endotoxin receptor CD14 gene and the CD14 density of unstimulated human monocytes and soluble CD14 plasma levels. *Intensive Care Med* 27 (11), 1770 (2001).
- 28 Holler, E. et al., Prognostic significance of NOD2/CARD15 variants in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation: effect on long-term outcome is confirmed in 2 independent cohorts and may be modulated by the type of gastrointestinal decontamination. *Blood* 107 (10), 4189 (2006).
- 29 Horner, C. et al., [Role of the innate immune response in sepsis]. *Anaesthesist* 53 (1), 10 (2004).
- 30 Hubacek, J. A. et al., The common functional C(-159)T polymorphism within the promoter region of the lipopolysaccharide receptor CD14 is not associated with sepsis development or mortality. *Genes Immun* 1 (6), 405 (2000).
- 31 Hugot, J. P. et al., Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411 (6837), 599 (2001).
- 32 Inohara, N. et al., Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem* 276 (4), 2551 (2001).

- 33 Inohara, N. et al., Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 278 (8), 5509 (2003).
- 34 Ito, D. et al., Polymorphism in the promoter of lipopolysaccharide receptor CD14 and ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* 31 (11), 2661 (2000).
- 35 Kabesch, M., A glitch in the switch? Of endotoxin, CD14, and allergy. *Am J Respir Crit Care Med* 174 (4), 365 (2006).
- 36 Kabesch, M. et al., A promoter polymorphism in the CD14 gene is associated with elevated levels of soluble CD14 but not with IgE or atopic diseases. *Allergy* 59 (5), 520 (2004).
- 37 Kalish, R. B. et al., Association of a maternal CD14 -159 gene polymorphism with preterm premature rupture of membranes and spontaneous preterm birth in multi-fetal pregnancies. *J Reprod Immunol* 70 (1-2), 109 (2006).
- 38 Koppelman, G. H. and Postma, D. S., The genetics of CD14 in allergic disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 3 (5), 347 (2003).
- 39 Lacroix, S., Feinstein, D., and Rivest, S., The bacterial endotoxin lipopolysaccharide has the ability to target the brain in upregulating its membrane CD14 receptor within specific cellular populations. *Brain Pathol* 8 (4), 625 (1998).
- 40 Laflamme, N. and Rivest, S., Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *Faseb J* 15 (1), 155 (2001).
- 41 Landmann, R. et al., Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in gram-negative septic shock. *J Infect Dis* 171 (3), 639 (1995).
- 42 Lange, J., Heinzmann, A., Zehle, C., and Kopp, M., CT genotype of promotor polymorphism C159T in the CD14 gene is associated with lower prevalence of atopic dermatitis and lower IL-13 production. *Pediatr Allergy Immunol* 16 (5), 456 (2005).

- 43 Lehnardt, S. et al., Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (14), 8514 (2003).
- 44 Leturcq, D. J. et al., Antibodies against CD14 protect primates from endotoxin-induced shock. *J Clin Invest* 98 (7), 1533 (1996).
- 45 LeVan, T. D. et al., A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. *J Immunol* 167 (10), 5838 (2001).
- 46 Leviton, A. et al., Maternal infection, fetal inflammatory response, and brain damage in very low birth weight infants. *Developmental Epidemiology Network Investigators. Pediatr Res* 46 (5), 566 (1999).
- 47 Lin, J. et al., Effects of Cd14-159 C/T Polymorphism on Cd14 Expression and the Balance between Proinflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in Whole Blood Culture. *Shock* (2007).
- 48 Linder, N. et al., Risk factors for intraventricular hemorrhage in very low birth weight premature infants: a retrospective case-control study. *Pediatrics* 111 (5 Pt 1), e590 (2003).
- 49 Loppnow, H. et al., Endotoxin activates human vascular smooth muscle cells despite lack of expression of CD14 mRNA or endogenous membrane CD14. *Infect Immun* 63 (3), 1020 (1995).
- 50 Macatonia, S. E. et al., Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺ T cells. *J Immunol* 154 (10), 5071 (1995).
- 51 Marodi, L., Neonatal innate immunity to infectious agents. *Infect Immun* 74 (4), 1999 (2006).
- 52 McDonald, C., Inohara, N., and Nunez, G., Peptidoglycan signaling in innate immunity and inflammatory disease. *J Biol Chem* 280 (21), 20177 (2005).
- 53 McIntire, D. D., Bloom, S. L., Casey, B. M., and Leveno, K. J., Birth weight in relation to morbidity and mortality among newborn infants. *N Engl J Med* 340 (16), 1234 (1999).

- 54 Medzhitov, R. et al., MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 2 (2), 253 (1998).
- 55 Nolte, E., Brand, A., Koupilova, I., and McKee, M., Neonatal and postneonatal mortality in Germany since unification. *J Epidemiol Community Health* 54 (2), 84 (2000).
- 56 Ogura, Y. et al., A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411 (6837), 603 (2001).
- 57 Ogura, Y. et al., Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 276 (7), 4812 (2000).
- 58 Pan, Q. et al., NF-kappa B-inducing kinase regulates selected gene expression in the Nod2 signaling pathway. *Infect Immun* 74 (4), 2121 (2006).
- 59 Pugin, J. et al., CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity* 1 (6), 509 (1994).
- 60 Pugin, J., Ulevitch, R. J., and Tobias, P. S., Activation of endothelial cells by endotoxin: direct versus indirect pathways and the role of CD14. *Prog Clin Biol Res* 392, 369 (1995).
- 61 Shimazu, R. et al., MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189 (11), 1777 (1999).
- 62 Simmons, D. L. et al., Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood* 73 (1), 284 (1989).
- 63 Sutherland, A. M., Walley, K. R., and Russell, J. A., Polymorphisms in CD14, mannose-binding lectin, and Toll-like receptor-2 are associated with increased prevalence of infection in critically ill adults. *Crit Care Med* 33 (3), 638 (2005).
- 64 Szebeni, B. et al., Genetic polymorphisms of CD14, toll-like receptor 4, and caspase-recruitment domain 15 are not associated with necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 42 (1), 27 (2006).

- 65 Takeuchi, O. et al., Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11 (4), 443 (1999).
- 66 Tapping, R. I. and Tobias, P. S., Cellular binding of soluble CD14 requires lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein. *J Biol Chem* 272 (37), 23157 (1997).
- 67 Unkelbach, K. et al., A new promoter polymorphism in the gene of lipopolysaccharide receptor CD14 is associated with expired myocardial infarction in patients with low atherosclerotic risk profile. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19 (4), 932 (1999).
- 68 Vitali, S. H. and Randolph, A. G., Assessing the quality of case-control association studies on the genetic basis of sepsis. *Pediatr Crit Care Med* 6 (3 Suppl), S74 (2005).
- 69 Vogel, I. et al., Biomarkers for the prediction of preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 84 (6), 516 (2005).
- 70 Wright, S. D. et al., CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249 (4975), 1431 (1990).
- 71 Yu, B., Hailman, E., and Wright, S. D., Lipopolysaccharide binding protein and soluble CD14 catalyze exchange of phospholipids. *J Clin Invest* 99 (2), 315 (1997).

Anhang 1

Studie „Kandidaten-Polymorphismen für schwere Erkrankungen des Frühgeborenen“

Aufklärungsbogen für Eltern

Liebe Eltern,

Ihr Kind wurde mit einem Geburtsgewicht < 1500 g weit vor dem errechneten Geburtstermin geboren. Nach der Geburt benötigen manche Frühgeborene sehr viel mehr technische Hilfe (Beatmung etc.) als andere, obwohl sie in der gleichen Schwangerschaftswoche geboren wurden. Trotz intensiver Forschung weiß man immer noch sehr wenig über die Ursachen für diese unterschiedlich schwere Ausprägung von Frühgeborenen-typischen Problemen. In letzter Zeit gibt es Hinweise darauf, dass bestimmte genetische Polymorphismen (das sind kleine Variationen der Erbsubstanz, die bei jedem Menschen vorkommen), den Verlauf von bestimmten Erkrankungen des Frühgeborenen beeinflussen können. Sollten sich unsere vorläufigen Untersuchungen bestätigen, so wäre dies von großer Bedeutung für die zukünftige Forschung, denn einige dieser Polymorphismen wurden gehäuft bei Frühgeborenen gefunden, die einen besonders unkomplizierten Verlauf hatten. Weiß man erst einmal, weshalb einige Frühgeborene z. B. ohne Beatmung auskommen, so kann man versuchen, diese genetische Eigenart durch Medikamente nachzuahmen, um so auch anderen Frühgeborenen zu helfen. Bislang ist jedoch nicht klar, welche Polymorphismen für frühgeborene Kinder besonders günstig oder ungünstig sind. Wir möchten Sie deshalb bitten, einer anonymisierten Untersuchung bestimmter Polymorphismen bei Ihnen und Ihrem Kind zuzustimmen. Für die Untersuchung benötigen wir lediglich jeweils 2 Mundschleimhautabstriche von Mutter und Kind und die Dokumentation der klinischen Verlaufsdaten. Die Abstriche werden mit einem sterilen Wattetupfer gemacht und bedeuten auch für sehr kleine Kinder keine Belastung. Es werden nur Polymorphismen untersucht, die für Erkrankungen des Frühgeborenen bzw. für das Auftreten von Frühgeburtlichkeit relevant sein könnten. Aus dem verwendeten Material werden keine anderen Untersuchungen durchgeführt, und die Datenschutzbestimmungen werden eingehalten. Da wir alle Untersuchungen aus Datenschutzgründen vollständig anonymisiert durchführen (d. h. alle Namen werden in unserem Labor durch Nummern ersetzt und die personenbezogenen Daten wie Name und Geburtstag werden vor Beginn der Untersuchung vollständig gelöscht) können wir Ihnen leider keine Untersuchungsergebnisse mitteilen. Wir hoffen, durch diese Studie kleinen Frühgeborenen in Zukunft noch besser helfen zu können. Falls Sie zu der Studie noch Fragen haben, wenden Sie sich bitte an die/den Ihr Kind behandelnde(n) Ärztin/Arzt bzw. an einen der unterzeichnenden Ärzte der Studienleitung.

Unterschrift NN
(lokale Studienleitung)

PD Dr. med. W. Göpel
(Studienzentrale Universitäts-
kinderklinik Lübeck)

Anhang 2

Studie „Kandidaten-Polymorphismen für schwere Erkrankungen des Frühgeborenen“

Einverständniserklärung

Hiermit erkläre ich/wir mein/unser Einverständnis zur Untersuchung meiner Mundschleimhautproben und der meines(r)/unseres(r) Kindes(r)

_____ geb. am _____

auf genetische Polymorphismen. Ich bin darüber aufgeklärt und einverstanden, dass die klinischen Verlaufsdaten meines Kindes weitergeleitet werden und dass die entnommenen Mundschleimhautproben ausschließlich in anonymisierter Form zur Erforschung von Risikofaktoren für Erkrankungen des Frühgeborenen und Frühgeburtlichkeit genutzt werden. Ich bin darüber informiert, dass aufgrund der anonymisierten Probenverarbeitung eine Befundmitteilung weder an mich noch an die mein Kind behandelnden Ärzte erfolgen kann.

Ort, Datum

Unterschrift des/der Erziehungsberechten

Anhang 3

Studie „Kandidatengen-Polymorphismen für schwere Erkrankungen des Frühgeborenen“

Dokumentationsbogen bei Einschluss in die Studie (1/3)

Name des Kindes		
Tag der Geburt:		
Geschlecht:	☐ männlich	☐ weiblich
Mehrling:	☐ nein	☐ ja
falls ja:	Mehrling Nr. _____	von _____
Geburtsgewicht:	_____ g	
„Inborn“ (Geburt in Klinik mit neonat. Intensivstation)	☐ nein	☐ ja
Lungenreifebehandlung vor der Geburt:	☐ nein	☐ ja
falls ja:	☐ Dexamethason	☐ Beclomethason
anderes Steroid, und zwar		
Tokolysebehandlung vor der Geburt:	☐ nein	☐ ja
falls ja	☐ Magnesium ☐ Fenoterol (Partusisten®) ☐ Atosiban (Tractotile®) ☐ andere Substanz und zwar _____ ☐ nicht bekannt	
Antenatale antibiotische Therapie:	☐ nein	☐ ja
falls ja, mit folgenden Antibiotika:		
Ursache der zu frühen Geburt:	☐ unhemmbare Wehen ☐ V. a. Amnioninfektionssyndrom ☐ EPH-Gestose ☐ patholog. CTG ☐ Plazentalösung ☐ Sonstiges: _____	
Herkunftsland der Mutter:	☐ Deutschland ☐ übriges Europa einschl. Russland ☐ naher Osten, einschl. Türkei u. Nordafrika ☐ Asien ☐ Afrika ☐ Sonstige: _____	
Vorausgegangene Geburten:	☐ nein	☐ ja
falls ja:		
Frühgeburten (vor der 37 + 0 SSW)	☐ nein	☐ ja

Hiermit wird die Richtigkeit der Angaben bestätigt.

Unterschrift (lokale Studienleitung)

Anhang 4

Studie „Kandidatengen-Polymorphismen für schwere Erkrankungen des Frühgeborenen“

Dokumentationsbogen Behandlung (2/3)

Name des Zentrums:
Name des Kindes
Geburtsdag

1. Prophylaktische Medikamente:

- Vitamin K : ☐ oral ☐ i.m. ☐ i.v.
weitere:
- ☐ Teicoplanin zur Prophylaxe der grampositiven Sepsis
☐ systemisch verabreichtes Fluconazol zur Prophylaxe von Pilzinfektionen
☐ Ibuprofen ☐ Indomethacin zur Prophylaxe eines persistierenden Ductus arteriosus
☐ Erythropoietin zur Prophylaxe einer Frühgeborenenanämie
☐ zur Prophylaxe von _____

2. Antibiotische Therapie

- ☐ nein ☐ ja
falls ja:
- ☐ Penicillin ☐ Ampicillin/Amoxicillin
☐ Cefotaxim ☐ Imipenem
☐ Gentamicin ☐ Tobramycin
☐ Erythromycin ☐ Vancomycin
☐ Teicoplanin ☐ Metronidazol
☐ _____

3. Katecholamintherapie

- ☐ nein ☐ ja
falls ja:
- ☐ Dopamin ☐ Dobutamin
☐ Noradrenalin ☐ Adrenalin
☐ _____

4. Analgetika und Sedativa

- ☐ nein ☐ ja
Falls ja:
- ☐ Midazolam (Dormicum®) ☐ Diazepam
☐ Morphin ☐ Fentanyl
☐ _____

5. Surfactant

- ☐ nein ☐ ja
falls ja, wie oft:
- ☐ 1 x ☐ 2 x ☐ 3 x ☐ ____ x
 Surfactantgabe ohne Intubation ☐ ja ☐ nein

6. Diuretika

- ☐ nein ☐ ja
falls ja:
- ☐ Furosemid (Lasix®)
☐ Hydrochlorothiazid
☐ Spironolacton (Aldactone®)
☐ _____

7. Inhalative Medikamente

- ☐ nein ☐ ja
falls ja:
- ☐ Salbutamol (Sultanol®)
☐ Ipratropiumbromid (Atrovent®)
☐ Fluticason (Flutide®)
☐ Budenosid (z. B. Pulmicort®)
☐ _____

8. Anzahl Bluttransfusionen

- ☐ keine ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ ____

9. Sonstige Medikamente

- ☐ nein ☐ ja
falls ja:
- ☐ _____
☐ _____
☐ _____
☐ _____
☐ _____

10. Zentral-venöse Katheter

- ☐ nein ☐ ja
falls ja:
- ☐ Nabelvenenkatheter
☐ Polyurethaneinschwemmkatheter
☐ Siliconeinschwemmkatheter
 Entfernung wegen Komplikationen??
☐ nein ☐ ja
falls ja, bitte Kathetertyp angeben:
- ☐ Dislokation (_____)
☐ Katheterinfektion (_____)
☐ Thrombose (_____)

11. Arterielle Katheter:

- ☐ nein ☐ ja
falls ja: ☐ Nabel ☐ periphere Arterienkatheter
 Kam es in Assoziation mit arteriellen Kathetern zu Extremitätennekrosen?
☐ nein ☐ ja

12. Atemunterstützung:

- ☐ nein ☐ ja
falls ja
- konventionelle Beatmung ☐ nein ☐ ja
 - Hochfrequenzbeatmung ☐ nein ☐ ja
 - mononasaler CPAP ☐ nein ☐ ja
 - binasaler CPAP ☐ nein ☐ ja
 - kam es zum Auftreten eines Pneumothorax bzw. Pneumomediastinums? ☐ nein ☐ ja
 ⇨ und zwar unter (z. B. mononasalem CPAP): _____

13. Nahrungsaufbau

Beginn am ____ . Lebenstag.
 Vollständig oral am ____ . Lebenstag

Hiermit wird die Richtigkeit der Angaben bestätigt

Unterschrift (lokale Studienleitung)

Anhang 5

Studie „Kandidatengen-Polymorphismen für schwere Erkrankungen des Frühgeborenen“

Dokumentationsbogen Verlauf (3/3)

Dieser Datenerhebungsbogen entspricht den Punkten 5/6, 14-16 und 19-24 des bundeseinheitlichen Neonatalerhebungsbogens. Alternativ kann deshalb statt diesem Blatt auch ein Ausdruck des Bogens verwendet werden. Bitte achten Sie in diesem Fall jedoch auf das vollständige Ausfüllen der oben genannten Felder und insbesondere auf die korrekte Angabe etwaiger operativer Prozeduren (siehe 9.)

Name des Zentrums:
Name des Kindes
Geburtsdag

1. Gestationsalter:
errechneter Geburtstermin: ____ . ____ . ____
oder
Gestationsalter: ____ Wochen + ____ Tage

2. Aufnahme
Körpertemperatur bei Aufnahme: ____ °C
Gewicht bei Aufnahme: ____ Gramm
Länge: ____ cm
Kopfumfang: ____ cm

3. Sauerstoffzufuhr
☐ nein ☐ ja
falls ja:
Beginn: ____ . ____ . ____
endgültige Beendigung: ____ . ____ . ____

4. Maschinelle Beatmung (nicht CPAP)
☐ nein ☐ ja
falls ja, Beginn: ____ . ____ . ____
endgültige Beendigung: ____ . ____ . ____
endg. Beendigung jegl. Atemhilfe: ____ . ____ . ____

5. Sepsis
☐ nein ☐ ja
falls ja, Beginn: ____ . ____ . ____
Erreger in Blut, Liquor oder Urin:
kein Keimnachweis (00) ☐
Staphyl. aureus (31) ☐
Staphyl. epidermidis (32) ☐
Streptokok. Gruppe B (33) ☐
Strep. Gruppe D (Enterokokken) (34) ☐
Strep. Andere Gruppen (35) ☐
Pneumokokken (36) ☐
E. coli (37) ☐
Klebsiella (38) ☐
Enterobakter (39) ☐
Serratia (40) ☐
Proteus (41) ☐
Pseudomonas aeruginosa (42) ☐
Listeria monocytogenes (43) ☐
Anaerobe Kokken (44) ☐
Bacteroides-Arten (45) ☐
Candida (46) ☐
andere Erreger (47) ☐

Typische klinische Symptomatik ☐ nein ☐ ja
Höchstes gemessenes CRP: ____ mg/dl
Höchster ermittelter I/T-Quotient: ____
wenn 2. Sepsis: Erreger lt. Kat.: ____
wenn 3. Sepsis: Erreger lt. Kat.: ____

6. Schädelsonogramm

☐ nein ☐ ja
falls ja:
IVH: ☐ nein ☐ ja
Falls ja: max. Stadium
Grad 1: subependymal ☐
Grad 2: < 50% Ventrikellumen ☐
Grad 3: > 50% Ventrikellumen ☐
Grad 4: intraparenchymatös ☐

Periventrikuläre Leukomalazie ☐ nein ☐ ja

7. Ophthalmologische Untersuchung

☐ nein ☐ ja
wenn ja, Retinopathie: ☐ nein ☐ ja
wenn ja, max. Stadium: ____

8. apparatives Hörscreening

☐ nein ☐ ja
falls ja: ☐ auffällig ☐ unauffällig

9. Operationen

operative Ligatur eines PDA ☐ nein ☐ ja
Laser- bzw. Kryotherapie bei ROP ☐ nein ☐ ja
abdominelle Operation bei NEC ☐ nein ☐ ja
abdominelle Operation bei fokaler
intestinaler Perforation ☐ nein ☐ ja
Anlage eines VP-Shunts ☐ nein ☐ ja
inguinale Herniotomie ☐ nein ☐ ja
sonstige Operationen ☐ nein ☐ ja

10. Entlassung:

Aufenthalt beendet am ____ . ____ . ____
Entlassung
Nach Hause ☐
Geburtshilfe ☐
andere Klinik ☐
Tod ☐
wenn verstorben: Ursache(ICD10): ____

11. weitere Diagnosen (ICD10):

Hiermit wird die Richtigkeit der Angaben bestätigt.

Unterschrift (lokale Studienleitung)

VIII. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei allen Menschen bedanken, ohne deren tatkräftige Unterstützung diese Arbeit in vielerlei Hinsicht nicht zustande gekommen wäre.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Göpel für die Bereitstellung des Themas, seine Ratschläge zum Erstellen dieser Dissertation seine Hilfe bei den statistischen Auswertungen, seine ansteckende Begeisterung und seinen Optimismus bei Unvorhergesehenem. Des Weiteren danke ich Herrn Professor Herting für die Möglichkeit, in seinem Institut promovieren zu dürfen, sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Materialien.

Ebenfalls besonders erwähnen möchte ich die medizinisch-technischen Assistentinnen Sabine Ziesenitz und Anja Sewe, die mich nicht nur in alle labortechnischen Verfahren eingewiesen haben und jederzeit bereit gewesen sind, mir bei Fragen weiterzuhelfen, sondern mich auch sehr herzlich aufgenommen haben.

Außerdem danke ich Birgit Roenspiess für äußerst produktive und gute Zusammenarbeit bei der Eingabe der Daten.

Abschließend gilt mein Dank in besonderer Weise meiner Familie und meinen Freunden für die bedingungslose motivierende und beispiellose Unterstützung sowie ihr uneingeschränktes Verständnis.

Lebenslauf

Familienname: Högemann
Vorname: Anne Margarete
Geburtsdatum: 06.05.1982
Geburtsort: Münster
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung:

1988-1992	Besuch der Katholischen Grundschule Celle
1992-1994	Besuch der Orientierungsstufe Westercelle
1994-2001	Besuch des Kaiserin-Auguste-Viktoria-Gymnasiums Celle
2001	Abitur mit der Note 1,5

Universitäre Ausbildung:

seit 2001	Medizinstudium an der Universität zu Lübeck
2003	Physikum
seit 2004	Dissertation in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Lübeck
2005	6 Wochen Famulatur im Red Cross Children's Hospital Kapstadt in der Traumatologie
08/2006 – 07/2007	Praktisches Jahr mit dem Wahlfach Gynäkologie und Geburtshilfe
10/2007	zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (2,0)

berufliche Karriere:

11/2007	Approbation
seit 1.1.2008	Assistentin für Gynäkologie am Campus Benjamin Franklin der Charité Berlin