

Aus dem Otto-Heubner-Centrum für Kinder- und Jugendmedizin  
Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Evaluation von Exon 1 Varianten im *MBL2* Gen  
als Risikofaktor für eine Sepsis bei  
Frühgeborenen mit sehr niedrigem  
Geburtsgewicht**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Uta Zegenhagen  
aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. Renate Nickel  
2. Prof. Dr. med. Christoph Bühner  
3. Prof. Dr. med. Rolf F. Maier

Datum der Promotion: 07.12.2007

Meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>9</b>
<b>1.1</b>	<b>MBL und Sepsis</b>	<b>10</b>
1.1.1	Funktionen von MBL	10
1.1.2	Die Struktur von MBL	11
1.1.3	MBL Bindungs-Spezifität	13
1.1.4	<i>MBL2</i> Gen und Varianten	13
1.1.5	Klinische Bedeutung von <i>MBL2</i> Varianten	16
<b>1.2</b>	<b>Sepsis bei VLBW Frühgeborenen</b>	<b>17</b>
1.2.1	Ätiologie der neonatalen Sepsis	17
1.2.2	Inzidenz der neonatalen Sepsis	18
1.2.3	Klinisches Bild und Verlaufsform einer Sepsis	19
1.2.3.1	Nekrotisierende Enterokolitis (NEC)	20
1.2.4	Diagnose einer Sepsis	21
1.2.5	Pathophysiologie der Sepsis	23
<b>1.3</b>	<b>Das Immunsystem VLBW Frühgeborener</b>	<b>25</b>
1.3.1	Angeborenes und erworbenes Immunsystem	25
1.3.2	Das Komplementsystem	28
1.3.2.1	MBL und seine Bedeutung für das Komplementsystem	29
<b>1.4</b>	<b>Genetik der Sepsis</b>	<b>31</b>
<b>2.</b>	<b>ZIELSETZUNG</b>	<b>32</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>Patientenpopulationen</b>	<b>33</b>
3.1.1	VLBW Frühgeborene	33
3.1.2	Datenanalyse	36
3.1.2.1	KISS	36
3.1.2.2	NEO-KISS	37
<b>3.2</b>	<b>Materialien</b>	<b>41</b>
3.2.1	Geräte	41
3.2.2	Verbrauchsmaterialien	41
3.2.3	Reagenzien und Chemikalien	42
3.2.4	Enzyme und Pufferlösungen	42
3.2.5	Primer und Sonden	42

<b>3.3</b>	<b>Methoden</b>	<b>42</b>
3.3.1	Gewinnung der DNA	42
3.3.2	DNA Extraktion	43
3.3.3	Polymerase Kettenreaktion	43
3.3.4	Schmelzkurvenanalyse (LightCycler-Technik)	44
3.3.4.1	Schmelzkurvenanalyse für <i>MBL2</i>	46
3.3.5	Statistische Auswertung	48
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>49</b>
<b>4.1</b>	<b>Sepsis</b>	<b>49</b>
4.1.1	Prävalenz einer Sepsis	49
4.1.2	Risikofaktoren für eine Sepsis bei VLBW Frühgeborenen	49
4.1.2.1	Sepsis und Geschlecht	49
4.1.2.2	Sepsis und Gestationsalter	50
4.1.2.3	Sepsis und Geburtsgewicht	52
4.1.2.4	Device-assoziierte Sepsitiden	53
4.1.3	Schwere Formen der Sepsis	53
4.1.3.1	NEC	53
4.1.3.2	Sepsis mit letalem Ausgang	54
<b>4.2</b>	<b>Pneumonie</b>	<b>54</b>
<b>4.3</b>	<b><i>MBL2</i> Exon 1</b>	<b>54</b>
4.3.1	<i>MBL2</i> Exon 1 Genotypverteilung bei VLBWs mit und ohne Sepsis	56
4.3.2	<i>MBL2</i> Exon 1 Genotypverteilung bei verstorbenen VLBWs	57
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>58</b>
<b>5.1</b>	<b>MBL Plasmakonzentrationen und genetische Studien bei Frühgeborenen</b>	<b>58</b>
5.1.1	<i>MBL2</i> Genotypfrequenzen bei Frühgeborenen	61
5.1.2	<i>MBL2</i> Allel- und Genotypfrequenzen in der vorliegenden Arbeit	62
5.1.2.1	Allgemeine Verteilung der <i>MBL2</i> Allele und Genotypen	62
5.1.2.2	<i>MBL2</i> Genotypen bei Sepsis	63
<b>5.2</b>	<b>Nosokomiale Infektionen bei VLBW Frühgeborenen</b>	<b>64</b>
5.2.1	Risikofaktoren für eine Sepsis bei VLBW Frühgeborenen	65
5.2.2	Bedeutung genetischer Faktoren bei einer Sepsis	67
<b>5.3</b>	<b>Sepsisdiagnostik und NEO-KISS</b>	<b>68</b>
<b>5.4</b>	<b>MBL und seine klinische Bedeutung</b>	<b>69</b>

<b>5.5</b>	<b>Bedeutung des <i>MBL2</i> Genotyps bei der Entwicklung einer Sepsis</b>	<b>72</b>
<b>5.6</b>	<b>MBL und Immunsuppression</b>	<b>73</b>
<b>5.7</b>	<b>Sepsis - eine multifaktorielle Genese</b>	<b>74</b>
<b>5.8</b>	<b>Problematik genetischer Studien</b>	<b>74</b>
5.8.1	Gen-Umwelt-Interaktionen	74
5.8.2	Gen-Gen-Interaktionen	74
5.8.3	Phänotypdefinition	75
5.8.4	Ethnizität	75
<b>5.9</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>76</b>
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>78</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>79</b>
<b>8.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>87</b>

## Abkürzungen

ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
C1-9	Komplementfaktor 1-9
CCM	Charité, Campus Mitte
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CPAP	Continuous Positive Airway Pressure
CrP	C-reaktives Protein
CVK	Charité, Campus Virchow Klinikum
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EONS	Early-onset-neonatal Sepsis
FG	Frühgeborene
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GA	Gestationsalter
GG	Geburtsgewicht
GMCSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
Ig	Immunglobulin
INF	Interferon
IL	Interleukin
I/T-Ratio	Immature/Total (neutrophile Granulozyten)
KISS	Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System
KNS	Koagulase-negative Staphylokokken
LONS	Late-onset-neonatal Sepsis
LPS	Lipopolysaccharide
MASPs	MBL-associated Serine Proteases
MBL	Mannose-bindendes Lektin
NEC	Nekrotisierende Enterokolitis
NEO-KISS	Neonatales-Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System
NICU	Neonatal Intensive Care Unit (neonatalogische Intensivstation)
NNIS	National Nosocomial Infections Surveillance
NRZ	Nationales Referenzzentrum
PAMPs	Pathogen-associated Molecular Patterns
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PRR	Pattern Recognition Receptor
PVK	Peripherer Venenkatheter
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrom

SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SP	Surfactant Protein
SSW	Schwangerschaftswochen
TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
VLBW	Very Low Birth Weight (Neugeborene < 1500 g Geburtsgewicht)
VLONS	Very-late-onset-neonatal Sepsis
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZVK	Zentral Venenkatheter
ZVD	Zentraler Venendruck

Kursiv gedruckte Abkürzungen bezeichnen jeweils das kodierende Gen des Moleküls.

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: MBL Proteinstruktur
- Abb. 2: Untereinheit von MBL mit Struktureinheit
- Abb. 3: Variante *MBL2* Allele mit Ausbildung funktionsloser Oligomere
- Abb. 4: Struktur des *MBL2* Gens - Promoterregion und Exon 1
- Abb. 5: Reihenfolge systemischer Infektionen bei VLBW Frühgeborenen
- Abb. 6: Sepsis Kaskade
- Abb. 7: Sepsispyramide
- Abb. 8: Interaktion von unspezifischen und spezifischen Abwehrmechanismen
- Abb. 9: Entwicklung einzelner Komponenten des Immunsystems bei Feten
- Abb. 10: Die drei Wege der Komplementaktivierung
- Abb. 11: MBL und MASPs
- Abb. 12: Komplexbildung MBL und MASP-2
- Abb. 13: Gestationsalter der VLBW Frühgeborenen
- Abb. 14: Geburtsgewicht der VLBW Frühgeborenen
- Abb. 15: Infektionsrate bei Neugeborenen, insbesondere bei VLBW Frühgeborenen
- Abb. 16: Guthrie-Kärtchen
- Abb. 17: Prinzip des FRET
- Abb. 18: Prinzip der Mutationsanalyse
- Abb. 19: Kurvenbeispiel einer Schmelzkurvenanalyse
- Abb. 20a,b: Geschlechterverteilung bei VLBW Frühgeborenen mit und ohne Sepsis
- Abb. 21a,b: Gestationsalter bei VLBW Frühgeborenen mit und ohne Sepsis/bei Sepsis
- Abb. 22a,b: Geburtsgewicht bei VLBW Frühgeborenen mit und ohne Sepsis/bei Sepsis
- Abb. 23: Verteilung der *MBL2* Genotypen
- Abb. 24: Vergleich von *MBL2* Genotypfrequenzen zwischen deutschen und türkischen VLBW Frühgeborenen im CVK
- Abb. 25a,b: Verteilung der *MBL2* Genotypen bei VLBW Frühgeborenen mit und ohne Sepsis



## **2. Zielsetzung der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit ist es, SNPs im *MBL2* Gen in Hinblick auf eine Sepsis bei VLBW Frühgeborenen zu evaluieren. Dazu wurden zwei Populationen von insgesamt 522 VLBWs für *MBL2* Varianten untersucht. Die dargelegten Untersuchungen sollen zeigen, ob Kinder die eine Variante im *MBL2* Exon 1 aufweisen, häufiger an einer Sepsis erkranken als VLBW Frühgeborene mit normalem *MBL2* Genotyp.

Risikofaktoren einer Sepsis bei VLBW Frühgeborenen sind zwar bekannt, erklären jedoch nicht die große Variabilität bezüglich der Häufigkeit oder des Schweregrads der Erkrankung. Genetische Faktoren könnten hier von maßgeblicher Bedeutung sein.

## 6. Zusammenfassung

Als Sepsis bezeichnet man eine schwere systemische Infektion komplexer und multifaktorieller Genese. Genetische Faktoren prädisponieren wahrscheinlich zur Entwicklung schwerer Infektionen. Als wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität übernimmt das Mannose-bindende Protein eine entscheidende Rolle bei der körpereigenen Abwehr. SNPs im Exon 1 des *MBL2* Gens in Kodon 52, 54 und 57 resultieren in niedrigen MBL Serumspiegeln und stehen in engem Zusammenhang mit einer erhöhten Suszeptibilität für Infektionen bei Erwachsenen und Kindern, vor allem unter Immunsuppression.

Frühgeborene sind in vielerlei Hinsicht immunsupprimiert. Ihre körpereigene Abwehr ist entscheidend von einem intakten angeborenen Immunsystem abhängig. Diese Arbeit untersuchte den Einfluss von funktionellen Varianten im Exon 1 des Kandidatengens *MBL2* (R52C, G54D, G57E) in zwei gut charakterisierten Patientenpopulationen von insgesamt 522 Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht < 1500 g (VLBW FG) der Charité (CVK und CCM) auf einen Zusammenhang mit der Entwicklung einer nosokomialen Sepsis. Das gesamte Patientenkollektiv wurde für die drei *MBL2* Exon 1 Varianten genotypisiert und heterozygote sowie homozygote/compound heterozygote Träger mit dem Wildtyp in Bezug auf die Häufigkeit einer Sepsis verglichen. Deutsche und türkische Patienten wurden im CVK getrennt voneinander betrachtet, um mögliche ethnische Unterschiede zu berücksichtigen.

Es konnte weder in der Gesamtpopulation (CVK und CCM) noch in einer der beiden ethnischen Gruppen des CVK eine signifikante Assoziation zwischen *MBL2* Genotypen und dem Auftreten einer Sepsis gefunden werden. Niedriges Gestationsalter, niedriges Geburtsgewicht und männliches Geschlecht stellten in dieser Arbeit Risikofaktoren für die Entwicklung einer Sepsis dar.

Um relevante genetische Risikofaktoren bei der Entstehung einer Sepsis bei VLBW Frühgeborenen zu finden, bedarf es weiterer Untersuchungen, vorzugsweise von Kandidatengenen, welche für Proteine der angeborenen Immunität kodieren.

## **8. Danksagung**

Mein herzlichster Dank gilt meiner Doktormutter Priv.-Doz. Dr. Renate Nickel. Ich danke ihr für die Möglichkeit, diese Arbeit zu schreiben, ihre intensive Betreuung, das mir entgegengebrachte Vertrauen und die vielen wertvollen Ratschläge, die mich stets motiviert haben, meine Arbeit voranzubringen.

Mein Dank gilt außerdem Prof. Michael Obladen, der meine Dissertation durch Kooperation mit der Klinik für Neonatologie erst ermöglicht hat.

Anja Kubinski danke ich für die wunderbare Einarbeitung in die Labortätigkeit, für ihre Hilfe beim Aufreinigen der DNA sowie die vielen fachlichen und freundschaftlichen Tipps zum wissenschaftlichen Arbeiten. Dr. Monika Berns danke ich herzlich für die intensive und freundliche Unterstützung meiner Dissertation und ihre Hilfe bei vielen der dazugehörigen Schwierigkeiten.

Prof. Wauer danke ich für die Teilnahme von Patienten aus der Neonatologie im Campus Mitte. Mein weiterer Dank gilt PD Dr. Heiko Witt sowie Claudia Güldner und Markus Braun, die mir im Labor hilfreich zur Seite standen. Boris Metze danke ich für seinen statistischen Beistand, seine stets offene Tür und dafür, dass er mir immer ein guter Ratgeber war. Für die Unterstützung bei der Datenanalyse mit Hilfe von NEO-KISS danke ich Frank Schwab vom Institut für Hygiene und Umweltmedizin. Andrea Ernert vom Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie danke ich für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Ein großes Dankeschön geht auch an meine Familie und Freunde. Durch ihr Interesse und stetes Nachfragen haben sie mir viel Kraft gegeben. Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern Gerda und Wolfgang Zegenhagen für ihren unterstützenden Rückhalt während meines Studiums und meiner Promotion, bei meinem Freund Nils Stolzenberg dafür, dass er mir den Rücken gestärkt hat und immer für mich da ist und bei meiner Freundin Julia Püschel, die mich immer wieder aufs Neue angesport und ermutigt hat.

Zu guter Letzt wird eine Arbeit erst dann gut, wenn sie fehlerfrei geschrieben ist. Für das Korrekturlesen danke ich herzlich Harald Stolzenberg und Julia Püschel.

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

## **Erklärung an Eides Statt**

hiermit erkläre ich, dass die Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind. Es handelt sich bei dieser Arbeit um meinen ersten Promotionsversuch.

Uta Zegenhagen

## Anhang 1-3: NEO-KISS Formulare

### Anhang 1: Patientenverlaufsbogen

Krankenhaus	_____																																
Patienten ID	_____															Bogen NR:	_____																
Aufnahmedatum	____/____/____																																
Monat	_____																																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	Σ	
Patient auf Station																																	
ZVK																																	
PVK																																	
Tubus																																	
CPAP																																	
Anti-biotika																																	
Am Ende des Monats werden die jeweiligen Summen gebildet. Wenn die Surveillance beendet wird (Gewicht des Kindes $\geq$ 1800 g bzw. Entlassung bzw. Tod), wird die Summe der Monatsummen auf den Patientenbogen übertragen.																																	
Bemerkungen:	_____																																
_____																																	

**Anhang 2:  
Patientenbogen zur Surveillance – NEO-KISS**

Krankenhaus \_\_\_\_\_ Patienten-ID \_\_\_\_\_

Geburtsdatum _____ falls nicht Geburtsdatum Aufnahme datum _____ Geburtsgewicht _____ g Gestationsalter _____ Wochen, Tage Geschlecht <input type="checkbox"/> männlich <input type="checkbox"/> weiblich	Mehrlingsgeburt <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> Zwillinge <input type="checkbox"/> Drillinge <input type="checkbox"/> mehr als Drillinge	CRIB-Score _____ Ende der Surveillance Datum _____ Grund <input type="checkbox"/> 1800 g erreicht <input type="checkbox"/> Verlegung o.ä. <input type="checkbox"/> gestorben
--	---	--

Patienten- und Device-Tage auf Station _____ _____ _____ _____	Patienten-Tage _____ _____ _____ _____	ZVK-Tage _____ _____ _____ _____	PVK-Tage _____ _____ _____ _____	TUBUS-Tage _____ _____ _____ _____	CPAP-Tage _____ _____ _____ _____	Antibiotika-Tage _____ _____ _____ _____
--	--	--	--	--	---	--

Bemerkungen \_\_\_\_\_

Nosokomiale Infektionen Sepsis <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein Anzahl _____
Pneumonie <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein Anzahl _____
NEC <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein Anzahl _____
Weitere _____ _____

**Anhang 3:  
Infektionsbogen Sepsis – NEO-KISS**

Krankenhaus \_\_\_\_\_ Patienten-ID \_\_\_\_\_

Sepsis auf Station \_\_\_\_\_

Datum Sepsisbeginn \_\_\_\_\_

PVK assoziiert  ja  nein

ZVK assoziiert  ja  nein

Erreger 1 \_\_\_\_\_

Erreger 2 \_\_\_\_\_

Erreger 3 \_\_\_\_\_

UND

Klinische Sepsis alle folgenden Kriterien: ▶ Betreuender Arzt beginnt geeignete antimikrobielle Therapie für Sepsis für mindestens 5 Tage <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein ▶ Kein Keimwachstum in der Blutkultur oder nicht getestet <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein ▶ Keine offensichtliche Infektion an anderer Stelle <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	durch Labor bestätigte Sepsis Erreger aus Blut oder Liquor isoliert und kein KNS (Keim ist mit Infektion an anderer Stelle nicht verwandt) <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein ODER KNS aus Blutkultur oder intravasalem Katheter isoliert <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein UND eines der folgenden Kriterien: ▶ CRP > 2,0 mg/dl <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein ▶ I/T-Ratio der neutrophilen Blutzellen > 0,2 <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein ▶ Leukozytopenie < 5/nl <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein ▶ Thrombozytopenie < 100/nl <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
---	---

zwei der folgenden klinischen Zeichen und Symptome:

▶ Fieber (> 38 °C) oder Temperaturinstabilität oder Hypothermie (< 36,5 °C) <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	▶ neu oder vermehrte Apnoe(en) (> 20 s) <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	▶ anderes Sepsiszeichen* <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
▶ Tachykardie (> 200/min) oder neu/vermehrte Bradykardien (< 80/min) <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	▶ unerklärte metabolische Azidose (BE < - 10 mval/l) <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	welche(s) _____ _____
▶ Rekapillarierungszeit > 2 s <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	▶ neu aufgetretene Hyperglykämie (> 140 mg/dl) <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	* u. a. Hautkolorit, erhöhter Sauerstoffbedarf (Intubation), instabiler AZ, Apathie