

Aus der Klinik für Neonatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Relevanz des Polymorphismus rs1617640 im Promotor des
Erythropoietin-Gens bei Frühgeborenen mit schwerer
Retinopathie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Carolin Rau

aus Halle/Saale

Datum der Promotion: 09.12.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abstrakt (deutsch)	III
Abstract (englisch)	IV
1. Einleitung	1
1.1 Die Frühgeborenenretinopathie (ROP)	1
1.1.1 Risikofaktoren	1
1.1.2 Pathogenese	2
1.1.3 Diagnostik und Klassifikation	3
1.1.4 Therapie	4
1.2 Genetische Risikofaktoren der Frühgeborenenretinopathie	4
1.2.1 Genetische Polymorphismen	5
1.2.2 Genetische Polymorphismen bei der Frühgeborenenretinopathie	5
1.3 Rekombinantes humanes Erythropoietin bei ROP	7
1.3.1 Erythropoietin	7
1.3.2 <i>Erythropoietin</i> -Gen	8
1.3.3 Endogene Erythropoietin-Synthese	11
2. Zielsetzung der Arbeit	12
3. Materialien	13
3.1 Studiendesign	13
3.1.1 Patientenkollektiv und Studienablauf	13
3.1.2 Datenerfassung	15
3.2 Geräte	16
3.3 Reagenzien und Hersteller	17
3.4 Filterpapierkarten vom Neugeborenencreening	17
3.5 Oligonukleotide	18
3.6 Software	18
4. Methoden	19
4.1 DNA-Reinigung	19
4.2 Polymerase-Kettenreaktion	19
4.3 Gelelektrophorese	20
4.4 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	21

4.5 Wiederholung der PCR	21
4.6 Aufreinigung der PCR-Produkte	21
4.7 DNA-Sequenzierung	22
4.8 Auswertung der Chromatogramme	22
4.9 Statistische Auswertung	23
5. Ergebnisse	24
5.1 Genotyp-Analysen des SNPs rs1617640.....	24
5.1.1 Analyse des SNPs rs1617640 unter Berücksichtigung einer rhEpo-Therapie bei Frühgeborenenanämie	25
5.2 Relevanz der Behandlung mit rekombinantem humanem Erythropoietin	27
5.3 Charakteristika der Patienten der Fall-Kontroll-Studie.....	29
5.4 Assoziation mit Erkrankungen des Frühgeborenen	32
5.5 Behandlungsparameter	32
5.5.1 Sauerstofftherapie und Beatmung	33
5.5.2 Parenterale Ernährung und Steroide.....	34
5.5.3 Bluttransfusionen und Eisensupplementierung	34
6. Diskussion	38
6.1 Assoziationsstudien zum SNP rs1617640 bei Erkrankungen des Erwachsenen.....	38
6.1.1 Assoziationsstudien bei proliferativer diabetischer Retinopathie	38
6.1.2 Assoziation des <i>EPO</i> -SNPs rs1617640 mit anderen Erkrankungen	41
6.2 ROP-Risiko unter rhEpo-Therapie	42
6.3 Überprüfung anderer Risikofaktoren für die Entstehung einer ROP	43
6.4 Zusammenfassung	46
7. Literaturverzeichnis.....	47
Eidesstattliche Versicherung	i
Lebenslauf	ii
Veröffentlichungen.....	iii
Danksagung	iv

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
CCM	Campus Charité Mitte
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CFU-E	<i>Colony Forming Unit-Erythroid</i>
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
CVK	Campus Virchow-Klinikum
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP(s)	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat(e)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EK	Erythrozytenkonzentrat
ELBW	<i>Extremely low birth weight</i>
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
Epo(-R)	Erythropoietin(-Rezeptor)
ESRD	<i>End-stage renal disease</i>
EVI1	<i>Ecotropic viral integration site 1/</i>
ExoI	Exonuklease I
Fw	<i>Forward primer</i>
FiO ₂	Inspiratorische Sauerstoffkonzentration
G	Guanin
GATA	Guanosin-Adenosin-Thymin-Adenosin
HAF	<i>Hypoxia associated factor</i>
HIF-1	<i>Hypoxia inducible factor-1</i>
HNF-4	<i>Hepatic nuclear factor-4</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
ICH	Intrakranielle Hämorrhagie
JAK	Janus-Kinase
kb	Kilobasenpaare
KG	Körpergewicht

MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MEL1	<i>MDS1-EVII-like-1</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
nt	Nukleotid
NEC	Nekrotisierende Enterokolitis
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-B</i>
NO	Stickstoffmonoxid
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
paO ₂	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDA	Persistierender Ductus arteriosus
PDR	Proliferative Diabetische Retinopathie
Rv	<i>Reverse primer</i>
rhEpo	Rekombinantes humanes Erythropoietin
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROP	<i>Retinopathy of prematurity</i>
SaO ₂	Arterielle Sauerstoffsättigung
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phoshatase</i>
SAP	Systemanalyse und Programmentwicklung
Smad-3	<i>Small mothers against decapentaplegic protein 3</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
Sp1	<i>Specificity protein 1</i>
SSW	Schwangerschaftswochen
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i>
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VHL	Von-Hippel-Lindau
VLBW	<i>Very low birth weight</i>
vs.	versus

Abstrakt (deutsch)

Einleitung: Sehr unreife Frühgeborene können an einer proliferativen Retinopathie (ROP) erkranken. Die pathophysiologische Ursache der ROP ist eine überschießende Neovaskularisation in der Retina, die bis zur Ablösung der Retina und damit zu einer Erblindung führen kann. Die Neovaskularisationen werden unter anderem durch angiogenetische Wachstumsfaktoren wie *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), *Insulin-like growth factor-1* (IGF-1) und Erythropoietin (Epo) stimuliert. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Polymorphismen in Genen, die für angiogenetische Wachstumsfaktoren kodieren, eine Rolle in der Pathogenese von Retinopathien spielen. Der *Single nucleotide polymorphism* (SNP) rs1617640 im Promotor des *EPO*-Gens begünstigt die Entstehung der proliferativen diabetischen Retinopathie (PDR), weil das T-Allel eine Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren schafft. Homozygote Träger des T-Allels haben eine 7,5-fach höhere Epo-Konzentration im Glaskörper als der GG-Genotyp.

Methoden: In einer retrospektiven Fall-Kontroll-Studie bei 72 *very low birth weight* (VLBW)-Frühgeborenen mit schwerer ROP und 70 alters- und gewichtsentsprechenden Kontrollen ohne schwere ROP wurde der Einfluss des SNPs rs1617640 im *EPO*-Gen auf die Assoziation mit einer höhergradigen ROP untersucht.

Ergebnisse: Der SNPs rs1617640 war nicht mit der schweren ROP assoziiert ($\geq 3^\circ$; $p = 0,86$). Bei Trägern des homozygoten Genotyps war auch eine Behandlung der Frühgeborenenanämie mit rekombinantem humanem Epo (rhEpo) nicht mit einer höheren Inzidenz der ROP $\geq 3^\circ$ assoziiert ($p = 0,52$). Frühgeborene mit ROP 0/1 $^\circ$ wurden allerdings häufiger mit rhEpo behandelt als solche mit schwerer ROP ($p < 0,001$). In dieser Studie bestätigte sich, dass die ROP $\geq 3^\circ$ signifikant assoziiert war mit früherem Beginn einer Transfusionsbehandlung mit Erythrozytenkonzentrat, größerem Transfusionsvolumen, geringerer kumulativer Eisen-supplementierung, längerer Beatmung, einer Sauerstoffsupplementierung mit FiO₂ von 1,0, längerer parenteraler Ernährung und Glukokortikoidbehandlung. Dies sind etablierte Risikofaktoren, was besagt, dass die Studienpopulation repräsentativ war.

Diskussion: Unsere Daten sprechen gegen einen Zusammenhang zwischen dem *EPO*-SNP rs1617640 und der schweren ROP, unabhängig von einer Behandlung der Frühgeborenenanämie mit rhEpo. Stattdessen konnten andere Risikofaktoren der hochgradigen ROP bestätigt werden. Die Behandlung der Frühgeborenenanämie mit rhEpo scheint im Sinne der Prävention einer höhergradigen ROP günstiger zu sein als die Behandlung mit Bluttransfusionen.

Abstract (englisch)

Introduction: Very premature infants can develop a proliferative retinopathy (ROP) caused by excessive retinal neovascularizations which can lead to retinal detachment and blindness. These neovascularizations are stimulated, amongst others, by angiogenic growth factors like Vascular endothelial growth factor (VEGF), Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and Erythropoietin (Epo). In recent years, it has been shown that polymorphisms in genes coding for angiogenic growth factors are involved in the pathogenesis of retinopathies. The Single nucleotide polymorphism (SNP) rs1617640 in the promoter of the *EPO* gene is associated with proliferative diabetic retinopathy (PDR) as it creates a binding site for transcription factors. Homozygous carriers of the T allele have a 7.5-fold higher Epo concentration in the human vitreous body than the GG genotype.

Methods: In a retrospective case-control study, 72 very low birth weight (VLBW) infants with severe ROP $\geq 3^\circ$ and 70 age- and weight-matched controls with ROP 0/1 $^\circ$ were examined for a potential association between the SNP rs1617640 in the *EPO* gene and severe ROP.

Results: The SNP rs1617640 was not associated with severe ROP ($\geq 3^\circ$, $p = 0,86$). Furthermore, carriers of the homozygous genotype did not display a higher incidence of ROP $\geq 3^\circ$ if treated with recombinant human Epo (rhEpo) for anemia of prematurity ($p = 0,52$). Infants with ROP 0/1 $^\circ$ were more frequently treated with rhEpo than infants with severe ROP ($p < 0,001$). In this study, confirming the results of earlier reports, ROP $\geq 3^\circ$ was significantly associated with earlier initiation of red blood cell transfusion, bigger volume of transfusion, lower cumulative iron supplementation, longer duration of mechanical ventilation, oxygen supplementation with a FiO_2 of 1.0, longer parenteral feeding and glucocorticoid treatment. These are well known risk factors, indicating that the study population was representative.

Conclusions: Our results do not support the association between the SNP rs1617640 and severe ROP independent of rhEpo treatment for anemia of prematurity. In contrast, established risk factors for severe ROP were confirmed. Therefore, VLBW infants may rather benefit from treating the anemia of prematurity with rhEpo in respect to prevention of a severe ROP than from red blood cell transfusions.

1. Einleitung

1.1 Die Frühgeborenenretinopathie (ROP)

Etwa jedes zwölfte Neugeborene wird in Deutschland zu früh geboren [1]. Eine Frühgeburt ist definitionsgemäß die Geburt vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche (SSW). Vor allem bei Frühgeborenen jünger als 32 SSW besteht ein erhöhtes Risiko, an einer Frühgeborenenretinopathie (englisch: ROP – *Retinopathy of prematurity*) zu erkranken. Die verbesserten Therapiemöglichkeiten in den letzten Jahrzehnten führten dazu, dass immer unreifere und leichtere Frühgeborene überleben. Die Mortalität der unter 32 SSW oder unter 1500 g geborenen Kinder beträgt nur noch 4,1 % [2]. Durch das Überleben sehr unreifer Frühgeborener (VLBW: *very low birth weight*, Geburtsgewicht unter 1500 g) stieg die relative Häufigkeit der Frühgeborenenretinopathie an [3]. In Deutschland erkrankten 3,32 % aller Frühgeborenen unter 32 SSW an einer ROP [2]. Bei der Frühgeborenenretinopathie handelt es sich um eine folgenschwere Erkrankung, da sie unbehandelt zu schweren psychomotorischen Entwicklungsverzögerungen und zur Erblindung führen kann. Sie stellt die dritthäufigste Ursache für Erblindung im Kindesalter dar [4]. Die *Retinopathia praematurorum* wurde erstmals von Terry 1942 beschrieben und als retrolentale Fibroplasie bezeichnet. Die retrolentale Fibroplasie beschreibt das am weitesten fortgeschrittene Stadium der ROP mit vollständiger Netzhautablösung [5]. Campbell erkannte im Jahr 1951 einen Zusammenhang der Erkrankung mit der Sauerstofftherapie [6]. Daraufhin wurde der großzügige Einsatz von Sauerstoff bei Frühgeborenen reduziert, wodurch die Inzidenz der Frühgeborenenretinopathie sank [7].

1.1.1 Risikofaktoren

Bei der Frühgeborenenretinopathie handelt es sich um eine multifaktoriell bedingte Erkrankung. Heute zählen die Unreife des Frühgeborenen sowie die erhöhte und fortgesetzte Sauerstoffzufuhr zu den gesicherten Risikofaktoren für die Entstehung einer ROP. Das Erkrankungsrisiko steigt bei hoher arterieller Sauerstoffsättigung (SaO_2) an [8]. Neben dem inspiratorischen Sauerstoffgehalt (FiO_2) spielen die Dauer der Sauerstoffzufuhr, eine Beatmung [9] und eine intensive Atemunterstützung [10] eine entscheidende Rolle. In verschiedenen Tiermodellen wurde nachgewiesen, dass ein häufiger Wechsel von Hyperoxie und Hypoxie ungünstig ist [11]. Dominierende Risikofaktoren bleiben das Gestationsalter und das Geburtsgewicht des Frühgeborenen [12]. Die Frühgeborenenretinopathie kommt fast

ausschließlich bei Kindern mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g und einem Gestationsalter unter 32 SSW vor. Das Risiko für eine schwere ROP ist bei Frühgeborenen unter 26 Gestationswochen und unter 800 g Geburtsgewicht besonders hoch [13]. Neben den Risikofaktoren, die mit der Sauerstoffzufuhr und Beatmung assoziiert sind, wurden weitere Faktoren mit der Entstehung der ROP in Verbindung gebracht. Dazu zählen das Volumen von transfundiertem Erythrozytenkonzentrat [14] und eine hohe Eisensupplementierung [15]. Weiterhin wurde beobachtet, dass Frühgeborene mit schwerer ROP häufiger rekombinantes humanes Erythropoietin (rhEpo) zur Prävention der Frühgeborenenanämie verabreicht bekamen [16, 17]. Weitere Risikofaktoren sind Hyperglykämie [18], systemische Steroidapplikation [19], Sepsis [20], Hyperkapnie und Hypokapnie sowie Apnoen [9]. Schließlich können genetische Faktoren für eine ROP prädisponieren, was nachfolgend erläutert wird.

1.1.2 Pathogenese

Die Frühgeborenenretinopathie ist pathogenetisch durch ein Zusammenspiel von Hyperoxie und Hypoxie sowie Veränderungen der Expression von angiogenetischen Wachstumsfaktoren wie *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) und Epo sowie *Insulin-like growth factor-1* (IGF-1) bedingt [21]. Die Pathophysiologie verläuft biphasisch (siehe Abbildung 1.1). Nach der Geburt kommt es zu einem raschen Anstieg des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes (paO_2) aufgrund der Umstellung von plazentarer zu pulmonaler Oxygenierung. Die Vaskularisation der Netzhaut ist beim Frühgeborenen jedoch noch nicht bis in die Peripherie abgeschlossen. Die Gefäßknospen der noch unreifen Retina erfahren durch die unphysiologisch hohe Sauerstoffkonzentration eine Hemmung ihrer Weiterentwicklung [22]. Im angloamerikanischen Sprachgebrauch wird dieser Abschnitt der Initiierung und Latenz auch Phase 1 (verzögerte physiologische retinale Gefäßentwicklung) genannt [23]. In Folge der verminderten Vaskularisation entsteht eine relative Hypoxie der peripheren Netzhaut, wodurch es zur verstärkten Bildung angiogenetischer Wachstumsfaktoren kommt [24, 25, 26]. Die Beatmung und Sauerstofftherapie bei bronchopulmonaler Dysplasie führen zusätzlich zu schwankenden Konzentrationen der hypoxieabhängigen Wachstumsfaktoren [27]. Genetisch determiniert steigt die IGF-1 Expression ab der 32+0 SSW an, wodurch das Krankheitsbild in die Proliferationsphase mit überschießender Neovaskularisation (Phase 2) übergeht [23]. Die IGF-1 Expression kann bei Kindern mit schwerer intrauteriner Wachstumsrestriktion in Kombination mit einer

Glukoseverwertungsstörung frühzeitig gesteigert werden und damit zu einem erhöhten ROP-Risiko führen [28].

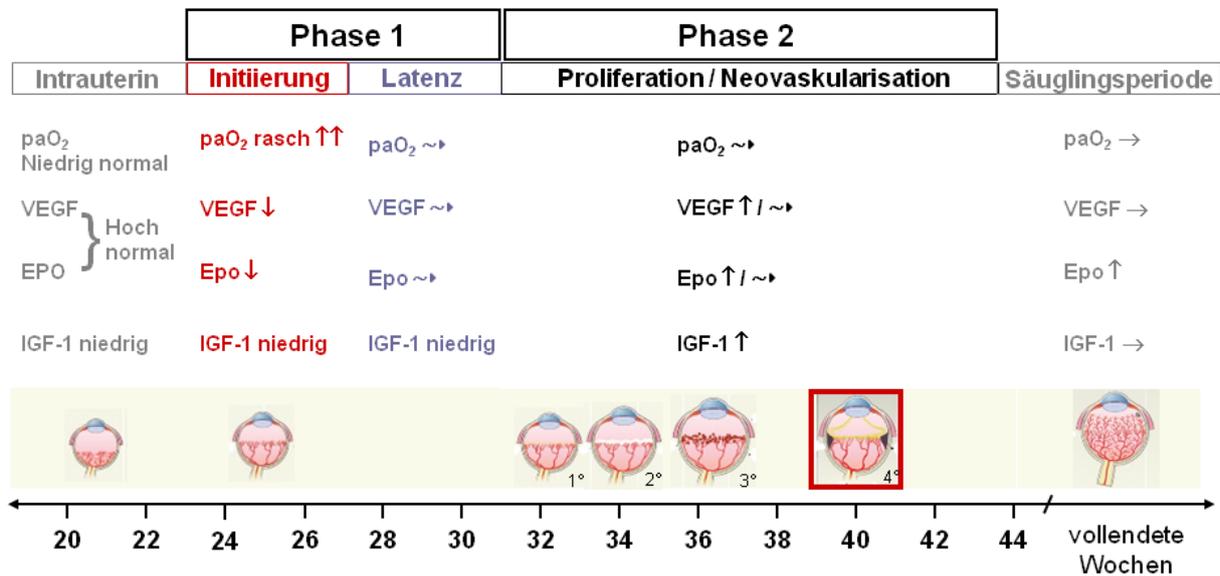


Abbildung 1.1 Pathophysiologie der Frühgeborenenretinopathie. Dargestellt ist die im Rahmen der ROP veränderte Expression angiogenetischer Wachstumsfaktoren im Kontext mit den Änderungen des Sauerstoffpartialdrucks. Die Zeichnungen stellen die einzelnen ROP-Stadien dar. Reproduced with permission from N Engl J Med 2011;364:603-15, Copyright Massachusetts Medical Society [29]. ↑ = ansteigend, ↓ = abfallend, → = konstant, ~→ = undulierend.

1.1.3 Diagnostik und Klassifikation

Die wichtigsten Maßnahmen zur Vermeidung langfristiger Schäden durch eine ROP sind das konsequente ophthalmologische Screening nach standardisierten Bedingungen bei Risikopatienten und die rechtzeitige Interventionsbehandlung. Die aktuelle „Leitlinie zur augenärztlichen Screening-Untersuchung von Frühgeborenen“ empfiehlt, Frühgeborene mit einem Gestationsalter unter 32 SSW und Frühgeborene mit einem Gestationsalter zwischen 32 und 36 SSW mit postnataler Sauerstoffzufuhr über drei Tage augenärztlich zu untersuchen [30]. Die Erstuntersuchung sollte in der sechsten Lebenswoche stattfinden. Nach der internationalen Klassifikation der Frühgeborenenretinopathie erfolgt die Lokalisation der Befunde anhand der Zoneneinteilung in Bezug auf den Abstand zur Papille in Zonen I bis III. Die Ausdehnung wird in 30°-Sektoren entsprechend den Uhrzeigerpositionen für die Stunden 1 bis 12 beschrieben (Abbildung 1.2). Es werden 5 Stadien der ROP unterschieden. Stadium 1 liegt vor, wenn eine dünne Linie zwischen vaskularisierter und avaskularisierter Netzhaut gebildet wird. Im zweiten Stadium ist diese Linie zu einer Leiste verdickt, und im Stadium 3 wachsen die Neovaskularisationen der Leiste in den Glaskörper ein. Im Stadium 4 kommt es

zur partiellen Ablösung der Netzhaut. Im fünften Stadium liegt eine vollständige Netzhautablösung vor. Ein zusätzliches Merkmal stellt die „*plus disease*“ dar, die durch blutgefüllte und geschlängelte retinale Gefäße gekennzeichnet ist [31, 32].

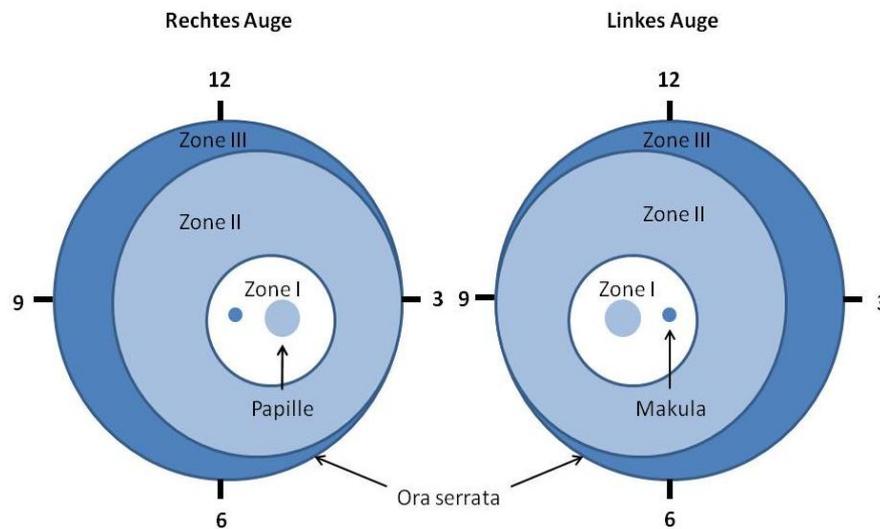


Abbildung 1.2 Einteilung der Zonen der Retinaentwicklung nach internationaler Klassifikation. In der Fundus-Skizze eines augenärztlichen Dokumentationsbogens wird der ophthalmologische Befund dokumentiert.

1.1.4 Therapie

Die meisten Frühgeborenen weisen nur ein geringes Stadium der ROP auf, welches sich meist spontan zurückbildet [33]. Eine Indikation zur Behandlung besteht, wenn eine sogenannte „*threshold disease*“ in Verbindung mit einer „*plus disease*“ vorliegt. Hierbei handelt es sich um ein fortgeschrittenes Stadium 3, bei dem extraretinale Proliferationen in fünf zusammenhängenden oder acht nicht zusammenhängenden 30°-Sektoren sichtbar sind [34]. Die Methode der Wahl war die Laserkoagulationstherapie [30]. Der Einsatz einer anti-VEGF Antikörpertherapie mit Bevacizumab setzt sich in der Klinik seit 2011 durch [29, 35].

1.2 Genetische Risikofaktoren der Frühgeborenenretinopathie

Die Unreife und Sauerstoffzufuhr sowie andere klinische Risikofaktoren sind vermutlich nicht die alleinige Ursache der ROP, da es Frühgeborene gibt, die bei gleichen klinischen Ausgangsbedingungen und ähnlichen Behandlungsverläufen einen unterschiedlichen Verlauf zeigen. Deshalb werden genetische Einflüsse in der Pathogenese der ROP eine Rolle spielen; dies wird mit Zwillingsstudien belegt [36]. Die Autoren zeigen, dass zirka 70 % der abweichenden ROP-Anfälligkeiten genetisch bedingt sind. Männliche Frühgeborene scheinen

häufiger betroffen zu sein, da sie zwei Drittel aller ROP-Patienten ausmachen [37, 38]. Weiterhin haben afroamerikanische Neugeborene eine niedrigere ROP-Inzidenz als kaukasische Neugeborene. Nur jedes vierte Kind mit „*threshold disease*“ ist dunkelhäutig [38, 39].

1.2.1 Genetische Polymorphismen

Zwei zufällig ausgewählte menschliche Individuen sind zu 99,9 % genetisch identisch. Die genetische Heterogenität von ungefähr 0,1 % beruht auf genetischen Polymorphismen in zirka drei Millionen Basenpaaren [40]. Bei einem genetischen Polymorphismus handelt es sich um einen durch Mutation entstandenen Unterschied in der Nukleotidsequenz der DNA. Die Häufigkeit der Sequenzvariation muss bei mehr als 1 % der Population auftreten, da es sich andernfalls um eine Mutation handelt. Drei Arten von Sequenzvariationen lassen sich unterscheiden. Dazu gehören Sequenzwiederholungen und Insertions- sowie Deletionspolymorphismen. Die einfachste und häufigste Form der genetischen Variation stellt der Einzel-Nukleotid-Polymorphismus (*single nucleotide polymorphism* - SNP) dar. Hierbei handelt es sich um den Austausch eines einzelnen Nukleotids in der DNA [40]. Es wird davon ausgegangen, dass ein SNP in 1000 Basenpaaren auftritt [41]. Die meisten genetischen Variationen durch SNPs kommen mit einer Inzidenz von mehr als 5 % in der Bevölkerung vor, wobei die Häufigkeit in den einzelnen ethnischen Gruppen stark variieren kann [40]. Vierundvierzig Prozent aller SNPs sind in Exons lokalisiert und führen in der Hälfte der Fälle zu veränderten Aminosäuresequenzen. Die restlichen SNPs befinden sich im nicht-kodierenden Bereich der DNA und haben keine Veränderung der Aminosäuresequenz zur Folge [42]. Vielmehr scheinen sie die Promotoraktivität und somit die Genexpression oder die mRNA-Stabilität zu beeinflussen. Diese Mechanismen können für die unterschiedliche Krankheitsanfälligkeit verschiedener Individuen verantwortlich sein [43, 44, 45].

1.2.2 Genetische Polymorphismen bei der Frühgeborenenretinopathie

In der Neonatologie wird die Rolle genetischer Polymorphismen als Ursache für die Prädisposition oder Pathogenese von Erkrankungen des Frühgeborenen zunehmend analysiert [46]. Auch bezüglich der ROP existieren internationale Studien, welche eine Assoziation zu genetischen Polymorphismen untersuchten. Dabei wurden vor allem Gene von angiogenese-regulierenden Faktoren, beispielsweise das *VEGF*-Gen, untersucht. VEGF ist essenziell für die normale Angiogenese. Zu hohe VEGF-Konzentrationen führen an der Retina jedoch zu

pathologischen Neovaskularisationen. Haplotypen der SNPs *VEGF* -460 T→C (rs833061) und +405 G→C (rs2010963), welche sich im Promotor bzw. in der 5' untranslatierten Region (UTR) des Gens befinden, sind mit der diabetischen Retinopathie assoziiert [47, 48]. Bei der Frühgeborenenretinopathie zeigen Träger des *VEGF* +405 C-Allels und des Haplotyps *VEGF* -460 TT/+405 CC ebenfalls ein erhöhtes ROP-Risiko [49]. Im Gegensatz dazu führt der SNP *VEGF* +405 G→C zu einer verminderten VEGF-Synthese [50]. Cooke *et al.* zeigten hingegen, dass das *VEGF* +405 C-Allel bei Neugeborenen ohne ROP im Verhältnis zu Neugeborenen mit ROP häufiger vorkommt [51]. Eine Metaanalyse konnte nur die Assoziation des SNPs *VEGF* -460 T→C mit schwerer ROP bestätigen [52].

Der Wachstumsfaktor IGF-1, der genetisch programmiert im letzten Trimester vermehrt exprimiert wird, spielt eine entscheidende Rolle in der normalen Entwicklung der retinalen Gefäße [28]. Balogh *et al.* konnten keine Assoziation zwischen der ROP und einem SNP im IGF-1-Rezeptor (*IGF-1R* +3174 G→A) feststellen [53], der niedrigere IGF-1-Serumkonzentrationen zur Folge hat [54].

Die vierfache statt fünffache Wiederholung eines 27-bp *Repeats* im Intron 4 des Gens der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (*eNOS*) führt zu einer verminderten NO-Synthese [55] und wurde als weiterer Risikofaktor der Frühgeborenenretinopathie identifiziert [56]. Diese erniedrigte NO-Produktion verschlimmert die retinalen Vasoobliterationen während der Initiierungsphase der ROP [57]. Weiterhin existiert ein SNP im *Norrie disease*-Gen (+597 C→A), welcher mit schwerer ROP assoziiert ist [58]. Tabelle 1.1 fasst die im Bezug auf ihre Assoziation mit dem Auftreten der ROP untersuchten SNPs zusammen.

Tabelle 1.1 Genetische Polymorphismen bei der ROP des Frühgeborenen. Die Häufigkeiten des Risiko-Allels sind aufgelistet. k.A.: keine Angaben. OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*.

Gen	OMIM	Genetischer Polymorphismus	Risiko-Allel (%)		p-Wert	Referenz
			Fälle	Kontrollen		
<i>VEGF</i>	192240	+405 G→C	41	30	<0,05	[49]
		-460 TT/+405 CC	15	1	0,01	[49]
		+405 G→C	30	41	0,03	[51]
<i>IGF-1-Rezeptor</i>	147370	+3175 G→A	45	48	>0,05	[53]
<i>eNOS</i>	163729	27-bp repeat b→a	24	15	0,015	[56]
<i>Norrie disease</i>	300658	+597 C→A	28	23	0,0001	[58]

1.3 Rekombinantes humanes Erythropoietin bei ROP

Seit Beginn der 1990er-Jahre war die rhEpo-Therapie eine etablierte Behandlungsmöglichkeit der Frühgeborenenanämie [59]. Im Jahr 2007 warnten jedoch die *Food and Drug Administration* und im Jahr 2015 auch das Paul-Ehrlich-Institut mit dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte vor der Anwendung von rhEpo bei Frühgeborenen [60, 61], da ein erhöhtes Risiko für das Auftreten der ROP nicht auszuschließen sei. Vor der rhEpo-Behandlung sollen die behandelnden Ärzte Nutzen und Risiko sorgfältig abwägen und alle Möglichkeiten zur Vorbeugung der Frühgeborenenanämie ausschöpfen [61]. Bereits seit 2006 bestand aufgrund von Metaanalysen zu Prävention bzw. Therapie der Frühgeborenenanämie mit rhEpo der Verdacht, dass die rhEpo-Therapie mit einem erhöhten Risiko für eine, vor allem höhergradige, ROP assoziiert ist [16, 62].

1.3.1 Erythropoietin

Die Hämatopoese wird durch eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren reguliert. Dabei handelt es sich zumeist um Glykoproteine, die die Proliferation und Differenzierung von Zellen stimulieren. Sie werden in fünf Hauptgruppen unterteilt. Zu der Gruppe der koloniestimulierenden Faktoren gehört Erythropoietin (Epo) [63]. Epo vermittelt seine biologische Wirkung durch Bindung an den Erythropoietin-Rezeptor (Epo-R). Der transmembrane Epo-R wird mit höchster Dichte auf späten erythroiden Vorläuferzellen des Typs CFU-E (*Colony Forming Unit-Erythroid*) exprimiert [64]. Die Bindung von Epo an den Epo-R führt zur Dimerisierung der beiden monomeren Anteile des Rezeptors, wodurch verschiedene Signaltransduktionskaskaden über JAK-STAT (*Janus-Kinase - Signal transducer and activator of transcription*) induziert werden [65]. Dadurch kommt es zur Transkriptionsinduktion verschiedener Gene, deren Produkte die Differenzierung, Proliferation und Apoptose von Erythrozyten-Vorläuferzellen regulieren. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass die Wirkung von Epo hauptsächlich in der Hemmung der Apoptose erythroider Vorläuferzellen besteht [66]. Rekombinantes humanes Epo kommt unter anderem bei der Therapie der Anämie bei terminaler Niereninsuffizienz zum Einsatz [60]. Neben seinen hämatopoetischen Eigenschaften besitzt Epo auch angiogenetische Funktionen [67]: Epo fördert die Angiogenese *in vitro* und *in vivo* durch Mobilisation, Migration und Proliferation von Endothel-Vorläuferzellen [68]. Unter hypoxisch-ischämischen Bedingungen kann Epo die Vaskularisation in der Retina und im Gehirn stimulieren [69, 70]. In Tiermodellen konnte nachgewiesen werden, dass unter Hypoxie die

Epo-Genexpression sowie die Expression des *Epo-R* in der Retina erhöht sind [71, 72]. Die *Epo*-Konzentration im Glaskörper von Frühgeborenen mit einer ROP im Stadium 4 ist im Vergleich zu Kontrollen 20- bis 30-fach erhöht [73]. Ähnliche Befunde wurden bei Messung der *Epo*-Konzentration im Glaskörper von Patienten mit einer Proliferativen Diabetischen Retinopathie beschrieben [71]. In Experimenten an Mäusen konnte die angiogenetische Wirkung von *Epo* an der Retina demonstriert werden. Außerdem gelang es im Mausmodell, die retinalen Neovaskularisationen durch Inhibition der *Epo*-Expression um 50 % zu reduzieren [74]. Dagegen kann die hyperoxie-induzierte Vasoobliteration in der Phase 1 der ROP-Pathogenese durch rh*Epo*-Injektionen in die Augen reduziert werden, während okuläre rh*Epo*-Injektionen in der Proliferationsphase die pathologische Neovaskularisation verstärken [69].

1.3.2 Erythropoietin-Gen

Das humane *EPO*-Gen ist auf Chromosom 7 in der Region q21-q22 lokalisiert [75]. Die aus 5,4 Kilobasenpaaren (kb) bestehende DNA ist in fünf Exons und vier Introns unterteilt [76]. Das humane *EPO*-Gen besitzt zahlreiche DNA-Sequenzen, die in die Regulation der Genexpression involviert sind. Die zwei wichtigsten regulatorischen Elemente sind der minimale 117 Basenpaare (bp) lange Promotor und der 50 bp lange Enhancer. Der minimale Promotor befindet sich in der 5` flankierenden Region des Gens. Bisher konnten dort vier Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren funktionell charakterisiert werden. Hierbei handelt es sich um eine Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren der GATA-Zinkfingerprotein-Familie, für das *Specificity protein 1* (Sp1), den Wilms-Tumorsuppressor (Wt1) sowie den *Hypoxia associated factor* (HAF) [77, 78, 79, 80]. Der minimale Promotor scheint eine entscheidende Funktion in der gewebespezifischen Expression des *EPO*-Gens zu besitzen [77]. Der Enhancer am 3`-Ende des Gens spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Genexpression unter Hypoxie. Die Genexpression wird durch Proteine vermittelt, die mit drei essenziellen Bindungsstellen interagieren. Dazu gehören eine Bindungsstelle für den *Hypoxia inducible factor-1* (HIF-1), ein CACA-Element für ein bislang unbekanntes Protein und eine Bindungsstelle für den *Hepatic nuclear factor-4* (HNF-4) [81, 82, 83]. Die Transkriptionsfaktoren werden über die Koaktivatoren CBP/p300 (*cAMP responsive element binding protein* (CREB) *binding protein*) und Smad-3 (*small mothers against decapentaplegic protein 3*) stabilisiert [84]. Mithilfe transgener Mäuse ist es gelungen, weitere *cis*-regulierende Elemente in der 5` flankierenden Region des *EPO*-Gens zu identifizieren. So befindet sich

zum Beispiel zwischen -6 und -0,4 kb relativ zur Transkriptionsstartstelle ein negativ regulierendes Element, welches die Genexpression nur auf die Leber und Niere einschränken kann (Abbildung 1.3) [85]. In dieser DNA-Sequenz wurden zahlreiche putative Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, wie *Activator protein 1* (AP-1), *Nuclear factor kappa-B* (NF-κB) und Sp1 gefunden [86]. Diese Transkriptionsfaktoren könnten an der negativen Regulation der Genexpression beteiligt sein. Weiterhin existiert ein hypoxie-induzierbares Element zwischen -14 kb und -6 kb relativ zur Transkriptionsstartstelle, welches vermutlich für die *EPO*-Expression in der Niere spezifisch ist [87]. Dieser Befund unterstreicht die Relevanz genregulierender Elemente außerhalb des minimalen Promotors in der 5' flankierenden Region des *EPO*-Locus.

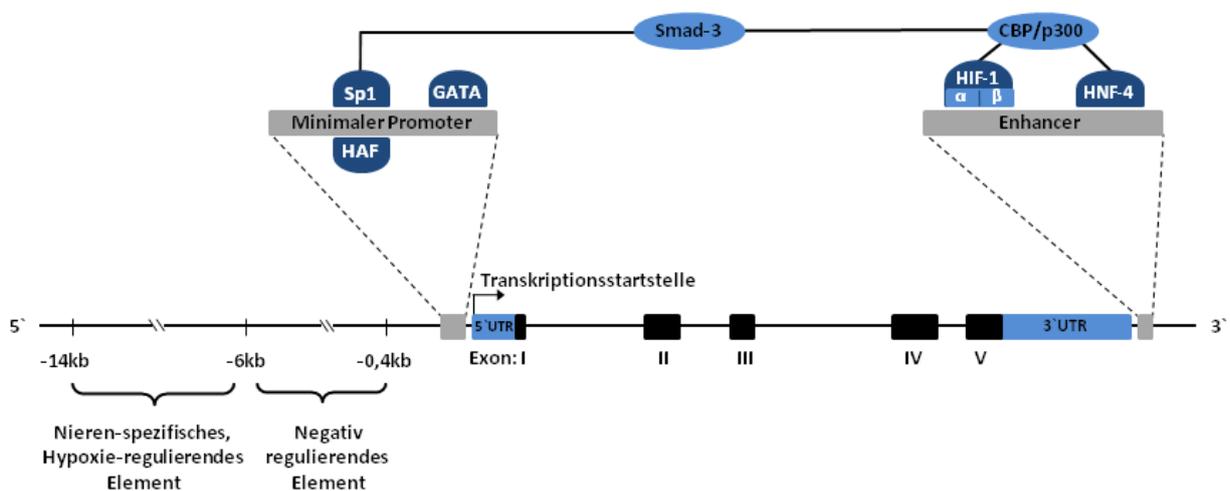


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung des humanen *EPO*-Gens. Im unteren Teil der Abbildung ist das *EPO*-Gen mit seinen fünf Exons in schwarz einschließlich der 5' und 3' untranslatierten Region in blau sowie der minimale Promotor und Enhancer in grau dargestellt. Zusätzlich sind das negativ regulierende Element zwischen -6 und -0,4 kb und das Nieren-spezifische, Hypoxie-regulierende Element zwischen -14 und -6 kb abgebildet. Im oberen Teil der Abbildung sind der Enhancer und der minimale Promotor sowie die daran bindenden Transkriptionsfaktoren in dunkelblau dargestellt. Über Kofaktoren (hellblau) interagieren Enhancer und Promotor miteinander.

Bislang sind in der genomischen Datenbank 33 genetische Polymorphismen in der Exon- und Intron-Sequenz des *EPO*-Gens publiziert worden. Daneben existieren zahlreiche SNPs im 3' Enhancer und 5' Promotor. Einige dieser SNPs wurden auf einen Zusammenhang mit einer Disposition für spezielle Krankheiten untersucht. Die meisten Studien konnten jedoch keine signifikante Assoziation zwischen einem SNP des *EPO*-Gens und einer Krankheit nachweisen [88, 89]. Tong *et al.* zeigten jedoch, dass das T-Allel im SNP rs1617640 signifikant mit einer Proliferativen Diabetischen Retinopathie (PDR) und chronischen Niereninsuffizienz im Endstadium bei Patienten mit Diabetes mellitus assoziiert ist [45]. Der SNP befindet sich in

Position -1125 bp bezogen auf die Transkriptionsstartstelle. Homozygote Träger des T-Allels haben eine 7,5-fach höhere Epo-Konzentration im Glaskörper des Auges als Träger des Genotyps GG (Abbildung 1.4A).

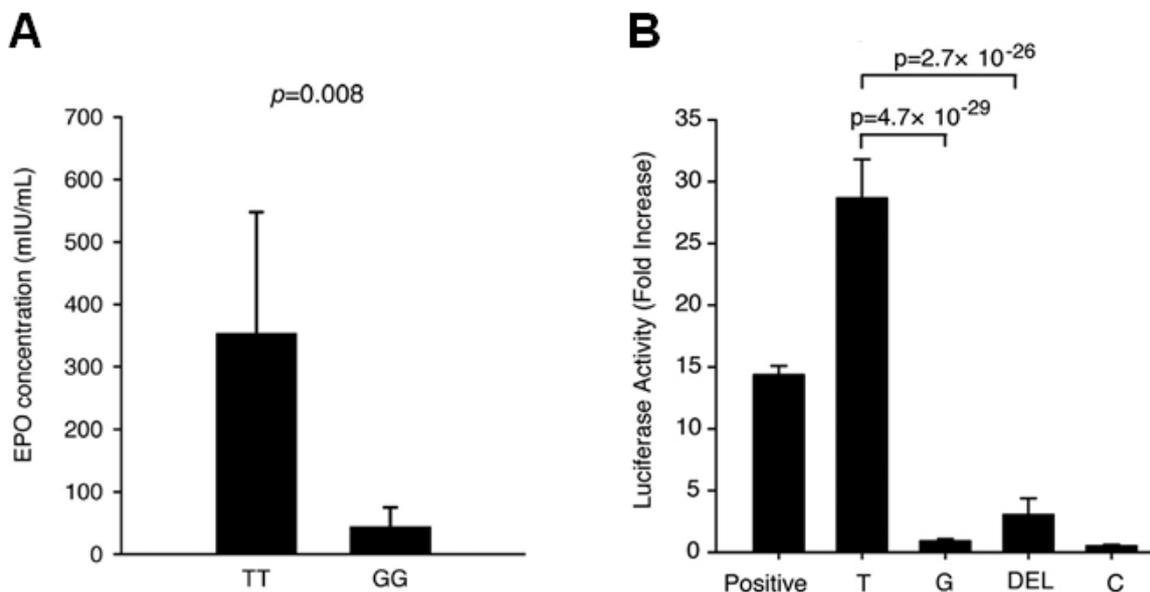


Abbildung 1.4 Experimentelle Untersuchungen des SNP rs1617640. A = Epo-Konzentration im Glaskörper von Patienten ohne Diabetes mellitus im Bezug auf ihren Genotyp des SNPs rs1617640. B = Luciferase-Reporterassay, der eine veränderte Aktivität des *EPO*-Promotors in Abhängigkeit vom SNP rs1617640 zeigt. Es sind jeweils der Mittelwert, die Standardabweichung und der p-Wert angegeben. Die Abbildungen wurden aus Tong *et al.* entnommen [45]. PNAS 2008;105:6998-7003, Copyright 2008 National Academy of Sciences.

Tong *et al.* konnten zeigen, dass das T-Allel des SNPs rs1617640 im Promotor des *EPO*-Gens die Expression eines Luciferase-Reportergens um das 25-fache im Vergleich zum G-Allel steigert (Abbildung 1.4B). Dies führt zu der Annahme, dass das T-Allel die Promotor-Aktivität des *EPO*-Gens positiv beeinflusst. Die Autoren der Studie sehen die Ursache der gesteigerten Promotor-Aktivität in einer vom T-Allel geschaffenen Bindungsstelle für die Transkriptionsfaktoren EVI1/MEL1 (*Ecotropic viral integration site 1/ MDS1-EVI1-like-1*) bzw. AP-1 außerhalb des minimalen Promotorbereichs. Insgesamt existieren bei Vorliegen des SNPs rs1617640 mit einer sehr hohen biomathematischen Wahrscheinlichkeit fünf potenzielle Bindungsstellen für vier verschiedene Transkriptionsfaktoren (Abbildung 1.5). In Mäusen, die das humane *Epo*-Gen überexprimieren (tg6 Mäuse), konnte gezeigt werden, dass die Expression der Transkriptionsfaktoren Tal1 und GATA1 im Knochenmark erhöht ist. Die vermehrte Aktivität von Tal1 und GATA1 am Promotor des *Epo*-R führt zu verstärkter Erythropoese [90].

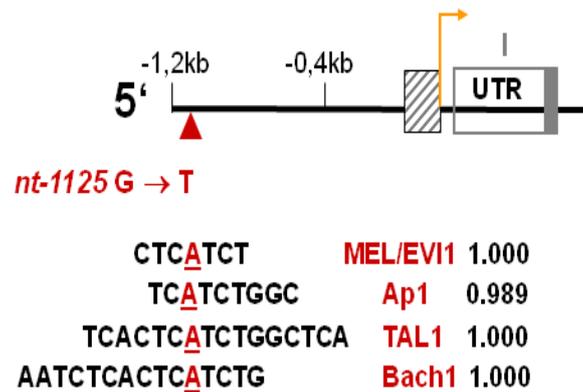


Abbildung 1.5 Vorhersage von transkriptionellen Bindungsstellen im Bereich des SNPs rs1617640 im *EPO*-Gen. Es sind die potenziellen Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren und ihre *in silico* vorhergesagte Wahrscheinlichkeit für eine Bindung beim SNP rs1617640 abgebildet. Die Abbildung wurde von Christof Dame zur Verfügung gestellt.

1.3.3 Endogene Erythropoietin-Synthese

Die hypoxisch-ischämische Regulation der *EPO*-Expression wird hauptsächlich durch HIF-1 vermittelt. HIF-1 ist ein Heterodimer bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit [91]. Während die β -Untereinheit permanent im Zellkern vorhanden ist, lässt sich die α -Untereinheit nur bei Hypoxie nachweisen, da Prolylhydroxylasen in Normoxie unter Sauerstoffverbrauch HIF- α hydroxylieren. Dadurch kommt es zur Bindung des HIF- α an das Tumorsuppressorprotein von-Hippel-Lindau (VHL) [92]. Die anschließende Polyubiquitinierung führt zum proteasomalen Abbau der α -Untereinheit. Bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck unterbleibt die Prolylhydroxylierung [93], HIF- α dringt in den Zellkern ein und verbindet sich mit der β -Untereinheit zu einem aktiven HIF-Komplex. Dieser Komplex bindet an die im Enhancer lokalisierte HIF-Bindungsstelle und rekrutiert weitere Koaktivatoren der Transkription wie p300. So wird die Transkription des *EPO*-Gens eingeleitet [94]. Im Tierversuch ist es gelungen, die Prolylhydroxylasen zu inhibieren, dadurch die Aktivität des HIF- α zu stabilisieren und die *Epo*-Genexpression zu erhöhen. Dies führt bei Mäusen zu einem verminderten, hyperoxie-induzierten retinalen Gefäßverlust während der ersten Phase der ROP-Pathogenese [95]. Weiterhin scheint die *Epo*-Genexpression in der Retina durch genetische Faktoren beeinflusst zu werden, da pigmentierte Mäuse eine mehr als doppelt so hohe *Epo*-mRNA Produktion besitzen wie Albinomäuse. Die Albinomäuse zeigen analog wesentlich geringer ausgeprägte Neovaskularisationen in der Retina unter initial hyperoxischen und dann hypoxischen Bedingungen [96].

2. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, in einer retrospektiven Fall-Kontroll-Studie zu klären, inwieweit die ROP sehr unreifer Frühgeborener mit dem SNP rs1617640 des *EPO*-Gens assoziiert ist. Dazu soll die Häufigkeitsverteilung der Genotypen in einer ausreichend großen Kohorte von Frühgeborenen mit schwerer ROP im Vergleich zu Frühgeborenen ohne schwere ROP analysiert werden. Zusätzlich werden von allen Patienten klinische Parameter erhoben, die mit einem erhöhten ROP-Risiko assoziiert sind. Dabei soll insbesondere der Effekt einer Behandlung der Frühgeborenenanämie mit rhEpo analysiert werden, weil rhEpo einerseits proangiogenetische Aktivitäten verstärken und andererseits auf die neuronalen Zellen der Retina zellprotektiv wirken könnte.

3. Materialien

3.1 Studiendesign

In dieser retrospektiven Fall-Kontroll-Studie wurden molekulargenetische Untersuchungen durchgeführt. Es wurde sich bewusst angesichts möglicher Implikationen des SNPs rs1617640 auf Erkrankungen des Erwachsenen, insbesondere auf eine diabetische Retinopathie und Nephropathie, gegen ein Studiendesign entschieden, bei dem das Ergebnis den Patienteneltern mitgeteilt werden sollte. Daraus begründete sich die Notwendigkeit einer doppelten Verblindung unter Hinzuziehung eines Datentreuhänders. Vorab wurde die Zustimmung der Ethikkommission der Charité eingeholt (Protokoll-Nummer: EA2/051/09).

3.1.1 Patientenkollektiv und Studienablauf

Mithilfe der Software SAP (Systemanalyse und Programmentwicklung) wurde entsprechend der Einschlusskriterien nach geeigneten Patienten in der Klinik für Neonatologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin Campus Virchow Klinikum (CVK) und Campus Charité Mitte (CCM) gesucht. In die Fall-Gruppe wurden alle Frühgeborenen mit schwerer ROP eingeschlossen. Als schwere ROP galt das Stadium 3 oder höher sowohl mit als auch ohne „plus disease“ [31]. Anschließend wurde eine Kontroll-Gruppe mit gleicher Stichprobenanzahl zusammengestellt. Wichtigstes Einschlusskriterium für einen Patienten der Kontroll-Gruppe war das Nichtvorhandensein einer ROP bzw. eine Begrenzung auf eine ROP mit Stadium 1. Damit Geschlecht, Gestationsalter und Geburtsgewicht keinen Einfluss auf die Ergebnisse der Studie haben, wurde eine stratifizierte Randomisierung zur Ermittlung der Kontroll-Gruppe durchgeführt. Auf diese Weise war gewährleistet, dass sich beide Kohorten in Bezug auf das Geschlecht, Geburtsgewicht und Gestationsalter möglichst ähnlich sind. Die Patientenakten wurden aus dem Zentralarchiv der Charité angefordert und auf Vollständigkeit geprüft. Patienten wurden ausgeschlossen, wenn in ihren Akten Dokumentationen über klinische Behandlungsparameter fehlten, die für die Studie relevant waren. Weiterhin wurden Frühgeborene ausgeschlossen, die nicht in der Charité geboren, vor der sechsten Lebenswoche entlassen bzw. verlegt wurden oder verstarben, da der Studie die Daten der gesamten ersten sechs Wochen (42 Tage) nach der Geburt zugrunde gelegt wurden. Zusätzlich wurden Patienten ohne ausreichend dokumentierte, ophthalmologische Untersuchung ausgeschlossen. Das Fließschema (Abbildung 3.1) stellt das Patientenkollektiv mit ein- bzw. ausgeschlossenen Frühgeborenen gemäß internationalem Standard dar.

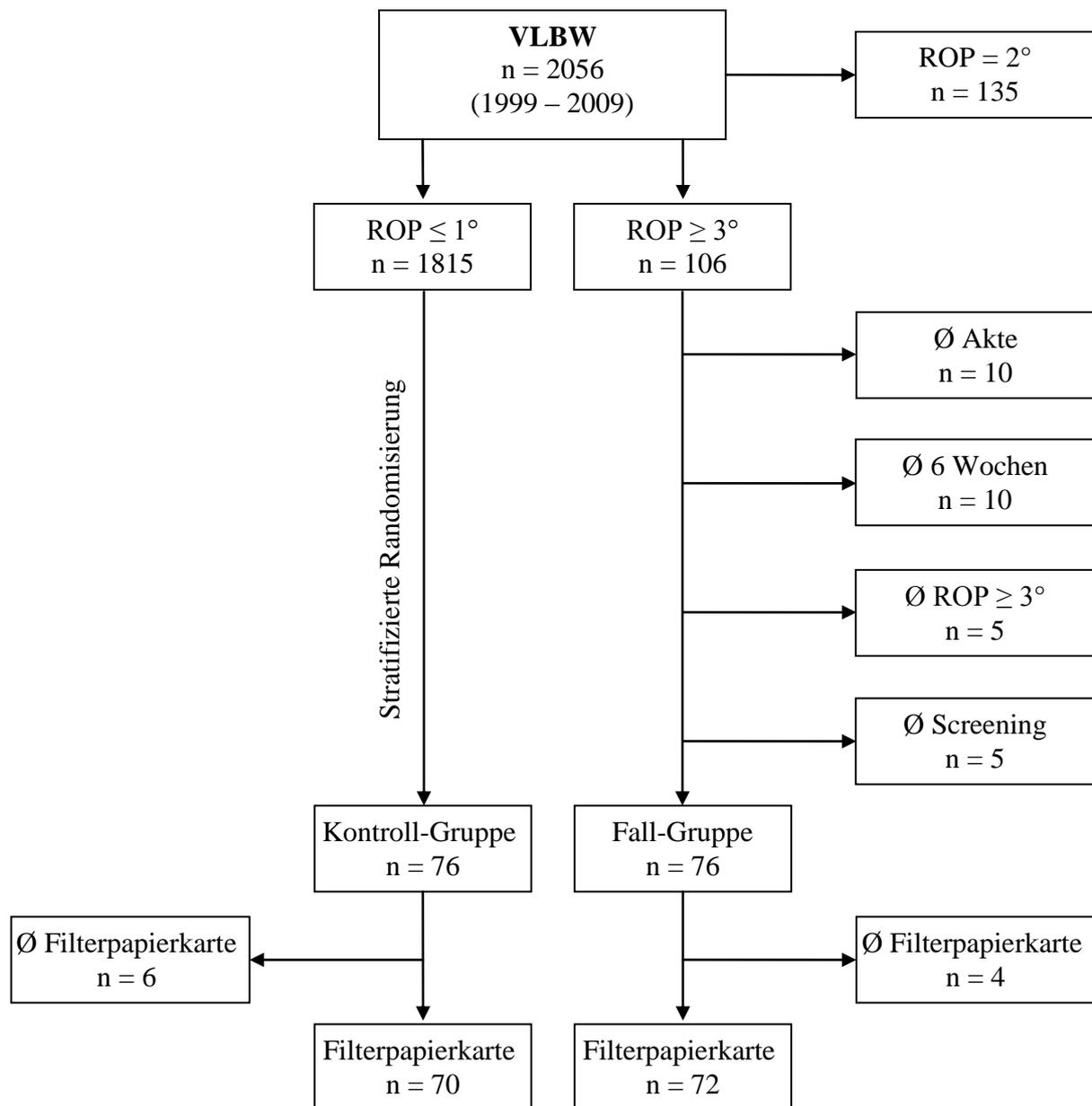


Abbildung 3.1 Patientenpopulation der retrospektiven Fall-Kontroll-Studie. Es sind die absoluten Häufigkeiten (n) angegeben. VLBW = very low birth weight infant. Ø = kein/keine.

Mit der Software SAP konnten 106 Frühgeborene mit ROP Stadium ≥ 3 identifiziert werden. Davon wurden 30 Frühgeborene ausgeschlossen. Zu ihnen zählten 10 Kinder, deren Akte im Zentralarchiv nicht auffindbar war, und weitere 10 Kinder, die erst postnatal in die Charité oder vor der vollendeten sechsten Lebenswoche in eine andere Klinik verlegt worden waren. Bei 5 Kindern wurde das Stadium der ROP falsch im SAP dokumentiert, da laut untersuchungsbezogenem augenärztlichen Befund keine höhergradige ROP vorlag. Es existierten von 4 Kindern keine Filterpapierkarten im Screeninglabor, und ein Frühgeborenes wurde aufgrund eines fehlenden Neugeborenen Screenings ausgeschlossen. Folglich bestand die Fall-Gruppe aus 76 Frühgeborenen. Entsprechend beinhaltete die Kontroll-Gruppe nach

stratifizierter Randomisierung ebenfalls 76 Kinder. Die Patienten der Fall- und Kontroll-Gruppe wurden zusätzlich in zwei Untergruppen aufgeteilt. Hierfür wurden Frühgeborene mit rhEpo-Therapie in die eine Untergruppe und Frühgeborene ohne rhEpo-Therapie in die andere Untergruppe eingeordnet. Für alle vier Gruppen wurde jeweils eine Excel-Tabelle erstellt. Der Name und das Geburtsdatum des Patienten sowie alle erhobenen Ausgangs- und Behandlungsparameter einschließlich der Nummer des Neugeborenen Screenings wurden in der Tabelle aufgelistet. Die Tabellen wurden anschließend dem Datenschutzbeauftragten der Charité und Datentreuhänder Dr. Bernd Pilgermann zur Anonymisierung übergeben. Nach der Anonymisierung wurden die entsprechenden Filterpapierkarten im Screeninglabor herausgesucht. Dabei konnte von 10 Kindern keine Filterpapierkarte gefunden werden. Somit mussten 4 Patienten aus der Fall- und 6 Patienten aus der Kontroll-Gruppe nachträglich ausgeschlossen werden. Die Anzahl der Patienten in der jeweiligen Gruppe ist in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1 Patientenkollektiv. Die Anzahl der Patienten in der jeweiligen Untergruppe sowie deren Gesamtanzahl sind angegeben.

	ROP $\geq 3^\circ$	ROP 0/1$^\circ$	Σ
Mit rhEpo-Therapie	35	54	89
Ohne rhEpo-Therapie	37	16	53
	72	70	142

Aus den restlichen Filterpapierkarten wurde durch einen Mitarbeiter des Screeninglabors, Herrn Bernd Berger, ein getrockneter Blutropfen ausgeschnitten und mit einer neuen Code-Nummer versehen. Mit dieser Strategie war eine vollständige Anonymisierung erreicht. Die ausgeschnittenen Filterpapierproben wurden in ihre entsprechende Untergruppe sortiert und der Arbeitsgruppe von Prof. Dame übergeben. Die experimentellen Arbeiten wurden in seinem Labor für Molekulare Neonatologie durchgeführt.

3.1.2 Datenerfassung

Aus den Patientenakten wurden vor der Anonymisierung der Datensätze klinische Parameter ermittelt, welche die Basisinformationen zu dem Patienten wiedergaben: Geburtsgewicht, Gestationsalter, Körpergröße, Kopfumfang, Geschlecht und ethnische Herkunft der Eltern.

Zur Klassifizierung der ROP wurden die Angaben zum maximalen Grad der Ausprägung der ROP, dem Verlauf der Erkrankung sowie einer eventuellen Laserkoagulationstherapie aus sämtlichen augenärztlichen Befunden erhoben. Die Akten wurden weiterhin bezüglich der Diagnosen Intrakranielle Hämorrhagie (ICH), Nekrotisierende Enterokolitis (NEC) und Persistierender *Ductus arteriosus* (PDA) ausgewertet. Zur Analyse der Relevanz einer rhEpo-Therapie wurden die einzelnen Dosierungen (Units/kg Körpergewicht) sowie die kumulative Dosis, die Applikationsart und der Lebensstag des Behandlungsbeginns ermittelt. Die rhEpo-Therapie erfolgte nach einem festen Therapieschema. Hierfür wurde dreimal wöchentlich eine dem Körpergewicht angepasste Dosis intravenös oder subkutan injiziert. Für die Bewertung einer Sauerstoffsupplementation der Atemluft wurden die Dauer der Sauerstoffzufuhr, die maximale inspiratorische Sauerstoffkonzentration (FiO_2) und die Art der Beatmung bzw. Atemunterstützung analysiert. Als weitere Risikofaktoren, die mit der Inzidenz oder Schwere der ROP assoziiert sind, wurden die Anzahl der Erythrozytentransfusionen, das Transfusionsvolumen, die Eisensupplementierung und eine Glukokortikoid-Therapie bei Bronchopulmonaler Dysplasie evaluiert. Zusätzlich wurde die Dauer der (teil-)parenteralen Ernährung erfasst. Alle klinischen Daten wurden für den gesamten Zeitraum der stationären Behandlung erhoben. Im Hinblick auf etablierte Faktoren zur Bewertung der Risikofaktoren für eine schwere ROP wurden die Daten der ersten sechs Lebenswochen in die epidemiologische bzw. statistische Auswertung einbezogen. Dadurch wurde die Homogenität der Datensätze gewährleistet und die Vollständigkeit erhöht.

3.2 Geräte

Tabelle 3.2 Geräte.

Name	Typ	Hersteller
Gelelektrophorese für Agarosegele	Midicell [®] PrimoTM	Thermo EC
PCR-Maschine	Mastercycler gradient	Eppendorf
PCR-Maschine	T 3000 Thermocycler	Biometra
Photospektrometer	Smartspec TM 3000	BioRad
Sequenziergerät	ABI PRISM [®] 3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Thermomixer	Comfort	Eppendorf
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Zentrifuge	5415D	Eppendorf
Zentrifuge	Galaxy mini	VWR

3.3 Reagenzien und Hersteller

Tabelle 3.3 Reagenzien und Hersteller.

Name	Hersteller
Chemikalien	
dNTP (100 mM)	Invitrogen
UltraPure™ Agarose	Invitrogen
Ethidiumbromid	Invitrogen
Ethanol absolut	J. T. Baker
Destilliertes Wasser, DNase und RNase frei	Sigma
Enzypuffer	
BigDye® Terminator Sequencing Buffer (5x)	Applied Biosystems
Green GoTaq® Puffer (5x)	Promega
Elektrophoresepuffer	
1x TAE-Puffer (pH 8.0)	40 M Tris 5 mM Natriumacetat 1 mM EDTA
Enzyme	
Exonuklease I	New England BioLabs
SAP	New England BioLabs
Proteinkinase K	Macherey-Nagel
GoTaq® DNA Polymerase (5 U/µl)	Promega
BigDye® Terminator v3.1	Applied Biosystems
Assays	
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
NucleoSpin® Tissue	Macherey-Nagel
BigDye® Terminator Sequenzierungs-kit	Applied Biosystems
DNA-Marker	
1 Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen

3.4 Filterpapierkarten vom Neugeborenen-Screening

Für die Sequenzierung wurden getrocknete Blutropfen auf Filterpapierkarten (Abbildung 3.2) verwendet. Im Rahmen des Neugeborenen-Screenings werden dem Kind mehrere Tropfen Blut

entnommen. Die Abnahme erfolgt nach vollendeten 36 bis 72 Lebensstunden. Es wird bei sehr unreifen Frühgeborenen bei vorzeitiger Abnahme oder pathologischen Befunden wiederholt. Für diese Studie wurden die Filterpapierkarten vom Erstscreening benutzt, da diese vor einer eventuellen Bluttransfusion entnommen werden.

Abbildung 3.2 Vorderseite einer Filterpapierkarte. Die vier gestrichelten Kreise auf der rechten Seite müssen mit Blut vollständig benetzt sein. Eine kleine ausgestanzte Probe wurde für die Sequenzierung verwendet.

3.5 Oligonukleotide

Tabelle 3.4 Primer-Sequenzen für die PCR. Die Sequenzen sind in 5'→3'-Richtung angegeben. Fw = Vorwärtsprimer, Rv = Rückwärtsprimer.

Gen	Primer Sequenzen	Produktgröße	Hersteller
EPO	Fw: GTC CAT TGT GCA GGA CAC AC	394 bp	Eurofins MWG Operon
	Rv: AAG GAT CTT CCT GCC TTG GT		

3.6 Software

Tabelle 3.5 Software.

Programm	Version	Hersteller
Chromas	2.3	Technelysium
SPSS Statistics	19	IBM
Microsoft Office Excel	2007	Microsoft Corporation

4. Methoden

4.1 DNA-Reinigung

Die Isolation der Gesamt-DNA für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde mithilfe des NucleoSpin® Tissue Kit der Firma Macherey-Nagel durchgeführt. Das Herstellerprotokoll für getrocknete Blutproben wurde als Vorlage verwendet. Lediglich die Elution wurde modifiziert, indem die DNA nach Zugabe von Elutionspuffer für 5 bis 10 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde.

4.2 Polymerase-Kettenreaktion

Durch die Auswahl spezifischer Primer kann mithilfe der PCR-Technik ein definierter DNA-Abschnitt amplifiziert werden. Die verwendeten Primer von Tong *et al.* [45] zeigten bei einigen Proben keine Amplifikation. Im Promotor des *EPO*-Gens wurde deshalb nach geeigneten Sequenzen gesucht und ein Rückwärtsprimer etabliert, mit dem die PCR-Analyse bessere Ergebnisse lieferte. Der Vorwärtsprimer von Tong *et al.* konnte verwendet werden. Die beiden Primer und die zu amplifizierende DNA-Sequenz wurden auf der Internetseite „National Center for Biotechnology Information“ in „BLAST“ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) auf ihre Spezifität getestet. Der GC-Gehalt der gewählten Primer liegt bei 50 bzw. 55 %, sie bestehen aus je 20 Nukleotiden und ihre Schmelztemperatur liegt bei 57,3 °C bzw. 59,4 °C. Die gewählten Primer sind für den gesuchten Sequenzbereich spezifisch. Die Länge des Amplikons beträgt 394 bp. Es befindet sich zwischen Nukleotid -3658 und -4051 bp des *EPO*-Gens. In Abbildung 4.1 ist die amplifizierte Sequenz angegeben.

```
nt -4051 GTCCATTGTGCAGGACACACATGCACCTTGACATCTGTTTATTTGACCT  
GTGGTGTAGGTTAGCTAGGCTGCATTGCTGAGTTCTTAAGAACTGAAATACAG  
CTAACACCAAGAGTGATGGGGGCTGGGATTTACAGCTAAGGTTTTATGGCTTCTG  
GAAACCCTGAGCCAGAGGGAGTGAGATTCCAGAGCAGGAGACCAAGACTAGCTG  
GTCTCTCACACCTTAGAAAGTGGCCTCGTCCTTGAGCCCTCAATGTCCTCATCTGT  
CAAATGGGTGTGGTGAACTACCAGCCTATCCCATTCAGGTTTCATAAAAGACAG  
GAAAGGTCCAGGCGCCGAGCTGACACCTATAATCCCAGCACTTTGGGAGACCA  
AGGCAGGAAGATCCTT nt -3658
```

Abbildung 4.1 Amplifizierte *EPO*-Promotor-Sequenz. Es ist die Sequenz des Minusstranges in 5'→3'-Richtung mit Angabe der Nukleotidposition (nt) im *EPO*-Gen dargestellt. Die beiden Primer sind dick gedruckt und unterstrichen. Das gesuchte Allel (hier: G) des SNPs rs1617640 ist grau unterlegt.

Für die PCR wurde ein Gesamtvolumen von 25 µl verwendet. Aufgrund der niedrigen DNA-Konzentration wurden standardmäßig 10 µl isolierter DNA für jeden Ansatz eingesetzt. In Tabelle 4.1 sind die Volumina und Konzentrationen der verwendeten Reagenzien aufgelistet.

Tabelle 4.1 Reagenzien des PCR-Ansatzes mit Volumina und Konzentrationen.

Volumen in µl	Reagenz	
10	DNA	
7,3	dH ₂ O	
5	Green GoTaq™ Puffer (5x)	1x
1	Vorwärtsprimer [10 µM]	10 pmol
1	Rückwärtsprimer [10 µM]	10 pmol
0,5	dNTPs [10 mM]	5 nmol
0,2	GoTaq® DNA Polymerase (5 U/µl)	1 U

Die Proben wurden im Eppendorf Mastercycler amplifiziert und anschließend bei 4°C gelagert. Die Tabelle 4.2 fasst das PCR-Programm zusammen.

Tabelle 4.2 PCR-Programm. Schritt 2 bis 4 wurde 30-mal wiederholt.

Schritt	Temperatur	Zeit	Vorgang
1	94°C	5 min	<i>Initialization</i>
2	94°C	30 sec	<i>Denaturation</i>
3	57°C	30 sec	<i>Annealing</i>
4	72°C	30 sec	<i>Elongation</i>
5	72°C	8 min	<i>Final Elongation</i>

4.3 Gelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte aufgetrennt und auf die erwartete Länge des Amplikons von 394 bp überprüft. Dazu wurde ein 1% Agarosegel hergestellt. 1 g Agarose wurde in 100 ml TAE-Puffer (1x) in der Mikrowelle erhitzt und anschließend wieder abgekühlt. Das flüssige Gel wurde zusammen mit 1,5 µl Ethidiumbromid in eine Gelkammer gegossen. Auf das Gel wurde zuerst ein 1 kb Plus DNA Ladder als DNA-Marker mit DNA-

Fragmenten definierter Längen aufgetragen. Anschließend folgten die amplifizierten PCR-Produkte. Der Green GoTaq™ Puffer (5x) enthält einen Ladepuffer. Für die Gelelektrophorese wurde eine Spannung von 0,015 V/cm Gellaufstrecke angelegt. Nach 25 min wurde das Gel unter UV-Licht analysiert. Das mittels PCR amplifizierte DNA-Fragment stellte sich durch das interkalierende Ethidiumbromid als fluoreszierende Bande dar. Jedes Gel wurde als Foto dokumentiert.

4.4 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Bei einigen PCR-Produkten wies das Agarosegel zusätzliche unspezifische Banden auf, die die Qualität der Sequenzierung mindern würden. Deshalb wurde bei diesen PCR-Proben eine Isolation des DNA-Fragments mit der erwarteten Produktgröße aus dem Agarosegel durchgeführt. Unter UV-Licht wurden diese Proben mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA-Extraktion erfolgte mittels QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben.

4.5 Wiederholung der PCR

In den Agarosegelen stellten sich einige PCR-Produkte nur als schwache Bande dar. Zur Verbesserung der Sequenzierqualität wurde der amplifizierte DNA-Abschnitt aus der ersten PCR als Template für eine zweite PCR eingesetzt. Das PCR-Programm der ersten PCR-Reaktion wurde beibehalten und wiederholt.

4.6 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden mittels Exonuklease-Phosphatase-Verdau gereinigt. Dazu wurden 0,32 µl *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP), 0,18 µl Exonuklease I (*ExoI*) und 2,5 µl destilliertes Wasser zu je 8 µl PCR-Produkt gegeben. Die *ExoI* verdaut hierbei einzelsträngige DNA wie Primer und die SAP hydrolysiert dNTPs. Dadurch werden die PCR-Ansätze von verbliebenen Primern und dNTPs, welche die Sequenzierreaktion beeinflussen können, befreit. Das Reaktionsgemisch wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 80°C für 15 min.

4.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde mit Hilfe des BigDye® Terminator Sequenzierungskits der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Die Reagenzien des Reaktionsansatzes mit einem Gesamtvolumen von 10 µl sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst. Die Kettenabbruch-Methode nach Sanger erfolgte im Mastercycler [97]. Das in Tabelle 4.4 dargestellte PCR-Programm wurde verwendet. Anschließend wurde die DNA-Sequenz mit dem ABI PRISM® 3130 Sequenzierungsgerät der Firma Applied Biosystems bestimmt.

Tabelle 4.3 Reagenzien des PCR-Ansatzes für die Sequenzierung.

Volumen in µl	Reagenz
3,75	dH ₂ O
3,5	Gereinigtes PCR-Produkt
1,5	BigDye® Terminator Sequencing Buffer (5x)
0,75	BigDye® Terminator v3.1
0,5	Vorwärtsprimer [10 µM]

Tabelle 4.4 PCR-Programm für die Sequenzierung. Schritt 2 bis 4 wurde 30-mal wiederholt.

Schritt	Temperatur	Zeit	Vorgang
1	95°C	5 min	<i>Initialization</i>
2	95°C	30 sec	<i>Denaturation</i>
3	55°C	15 sec	<i>Annealing</i>
4	60°C	30 sec	<i>Elongation</i>
5	60°C	8 min	<i>Final Elongation</i>

4.8 Auswertung der Chromatogramme

Die Nukleotidsequenz des amplifizierten DNA-Abschnittes wurde mit der Software Chromas 2.3 von der Firma Technelysium analysiert. Dazu wurde die Base des SNPs rs1617640 im Bereich zwischen Nukleotid 140 bis 150 aufgesucht und das Allel entsprechend der Signalintensität für die jeweilige Base bestimmt. In Abbildung 4.2 sind drei Beispielchromatogramme gezeigt.

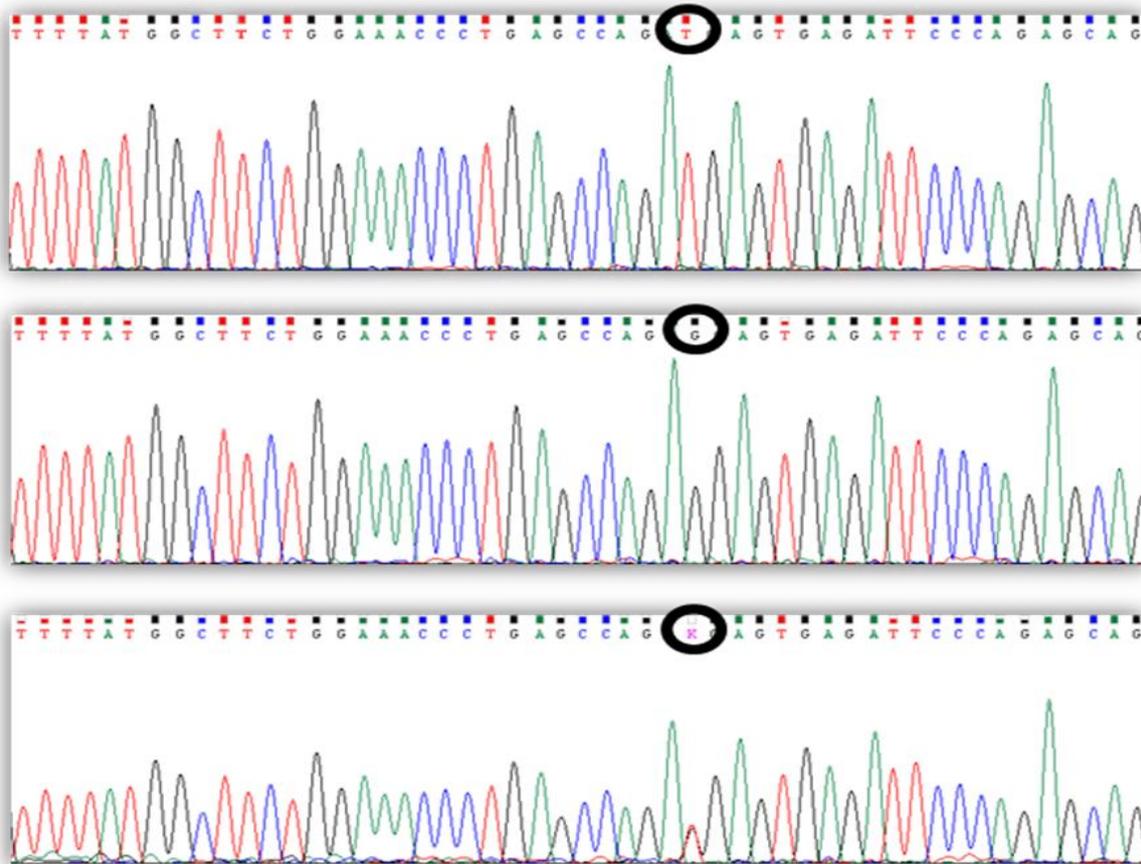


Abbildung 4.2 Chromatogramme der Analyse des SNPs rs1617640. Die schwarzen Kreise heben das Allel das SNPs rs1617640 hervor. Das obere Chromatogramm stellt einen homozygoten Träger des Allels T, das mittlere Chromatogramm einen homozygoten Träger des Allels G und das untere Chromatogramm einen heterozygoten Träger dar.

4.9 Statistische Auswertung

Die statistischen Berechnungen erfolgten mit der Software IBM SPSS Statistics 19 für Windows. Bei zwei unabhängigen Stichproben wurde zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen der Fall- und Kontroll-Gruppe der Mann-Whitney-U-Test für nicht-parametrische Stichproben benutzt. Der Mann-Whitney-U-Test wurde bei mehr als zwei unabhängigen Stichproben durch den Kruskal-Wallis-Test ersetzt. Zum Vergleich zweier kategorischer Variablen wurde der Chi-Quadrat-Test nach Pearson verwendet. Bei erwarteten Häufigkeiten < 5 wurde anstelle des Chi-Quadrat-Tests der Exact Test nach Fisher angewendet. Alle statistischen Analysen erfolgten zweiseitig. Testergebnisse mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet. Zur Datensammlung sowie zur Erstellung von Diagrammen wurde die Software Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) verwendet.

5. Ergebnisse

5.1 Genotyp-Analysen des SNPs rs1617640

Es galt zu klären, ob der SNP rs1617640 im Promotor des *EPO*-Gens mit schwerer ROP assoziiert ist.

Bei 40,3 % der Frühgeborenen mit $ROP \geq 3^\circ$ lag das T-Allel homozygot vor, bei Kindern ohne schwere ROP in 35,7 % der Fälle ($p = 0,86$). Homozygote Träger des G-Allels kamen in beiden Gruppen deutlich seltener vor. In der Fall-Gruppe hatten 9,7 % und in der Kontroll-Gruppe 11,4 % der Frühgeborenen den Genotyp GG (Abbildung 5.1). Über die Hälfte aller Kinder waren heterozygot (50,0 % der Fälle vs. 52,8 % der Kontrollen).

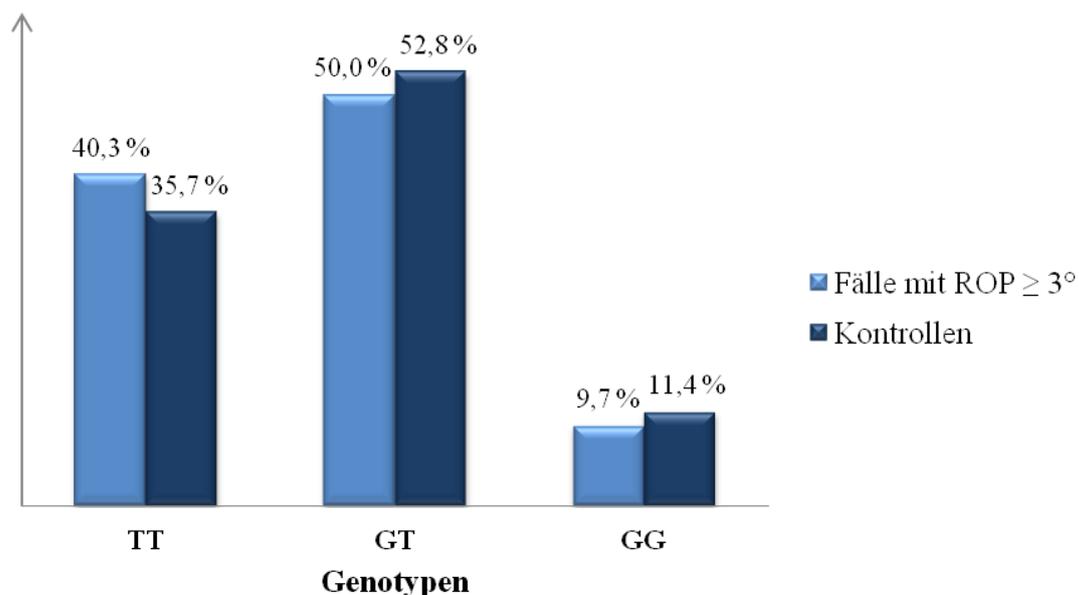


Abbildung 5.1 Genotypen des Epo-SNPs rs1617640. Es sind die Prozentsätze der Genotypen von den Patienten der Fall- und Kontroll-Gruppe dargestellt. Der p-Wert von 0,86 wurde mithilfe des Chi-Quadrat-Tests berechnet.

Einige Studien, die sich mit der Analyse genetischer Polymorphismen beschäftigen, berechnen neben der relativen Häufigkeit aller drei Genotypen auch die Frequenzen der beiden Allele in der Fall- und Kontroll-Gruppe. Dazu wurden die Patienten mit heterozygotem Genotyp zu gleichen Teilen auf die Träger mit homozygotem Genotyp TT und GG aufgeteilt (Abbildung 5.2).

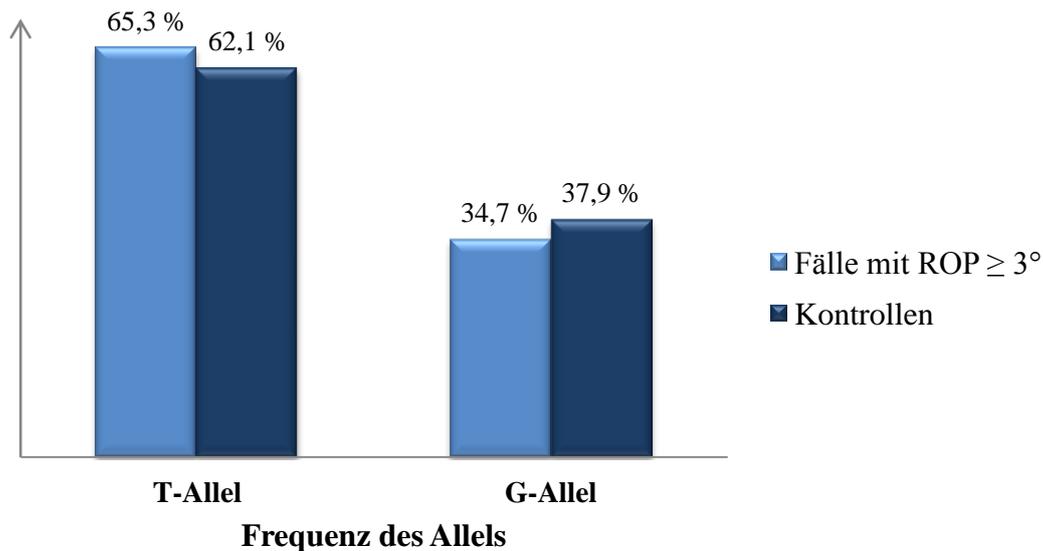


Abbildung 5.2 Frequenzen des T- und G-Allels. Die Patienten mit heterozygotem Genotyp wurden zu gleichen Teilen den Patientengruppen mit homozygotem Genotyp zugeteilt. Aus der daraus resultierenden absoluten Patientenzahl mit einem T- oder G-Allel wurden die Prozentsätze berechnet. Der p-Wert beträgt 0,86.

Auch bei der Allelfrequenz ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Kohorten ermitteln. 65,3 % aller Kinder mit schwerer ROP hatten mindestens ein T-Allel. In der Kontroll-Gruppe lag die berechnete relative Häufigkeit bei 62,1 %. Der prozentuale Unterschied von 3,2 % wies im exakten Test nach Fisher keine statistische Signifikanz auf ($p = 0,86$).

5.1.1 Analyse des SNPs rs1617640 unter Berücksichtigung einer rhEpo-Therapie bei Frühgeborenenanämie

Der folgende Abschnitt beschäftigt sich mit der zusätzlich durchgeführten Unterteilung der Patienten der Fall- und Kontroll-Gruppe in zwei Untergruppen jeweils mit oder ohne rhEpo-Therapie. Jeder Patient, der in den ersten sechs Lebenswochen mindestens einmal rhEpo verabreicht bekam, wurde in die Untergruppe „rhEpo-Therapie“ eingeteilt. Fünfunddreißig Kinder mit schwerer ROP und 54 Kinder ohne schwere ROP erhielten rhEpo.

Der Genotyp TT fand sich häufiger in der Gruppe mit schwerer ROP plus rhEpo-Therapie als in der analogen, rhEpo-behandelten Kontroll-Gruppe (45,7 % vs. 31,4 %). Mehr als die Hälfte der Frühgeborenen ohne ROP, aber mit rhEpo-Therapie, hatte einen heterozygoten Genotyp (55,6 %). Der prozentuale Unterschied zwischen beiden Gruppen ergab im Chi-Quadrat-Test keine statistische Signifikanz ($p = 0,52$). Bezüglich des Genotyps GG lag kein auffälliger Unterschied zwischen beiden Gruppen vor (Abbildung 5.3).

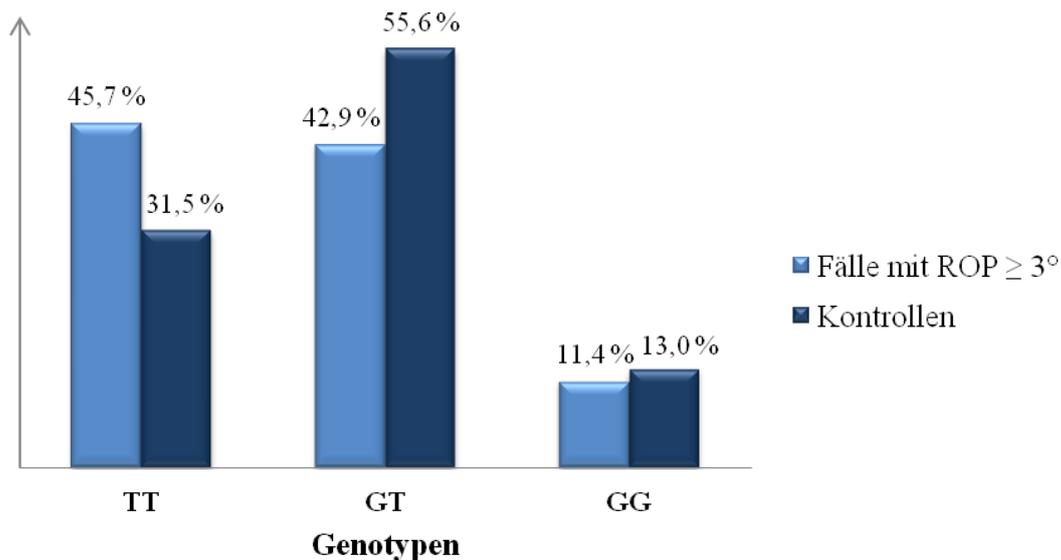


Abbildung 5.3 Genotypen des SNPs bei Patienten mit rhEpo-Therapie. Dargestellt sind die Prozentsätze der einzelnen Genotypen von den Patienten der Fall- und Kontroll-Gruppe, die in den ersten sechs Lebenswochen rhEpo erhielten. Der mittels Chi-Quadrat-Test erhobene p-Wert beträgt 0,52.

Die gleiche Analyse wurde auch für Patienten vorgenommen, die in dem gesamten Beobachtungszeitraum kein rhEpo verabreicht bekommen hatten (Abbildung 5.4). Die Untergruppe dieser Fälle umfasste nahezu den gleichen Stichprobenumfang wie die Untergruppe der Fälle mit rhEpo-Therapie (37 Kinder). Frühgeborene ohne schwere ROP und ohne rhEpo-Therapie machen die kleinste aller vier Untergruppen mit lediglich 16 Kindern aus (Tabelle 5.1).

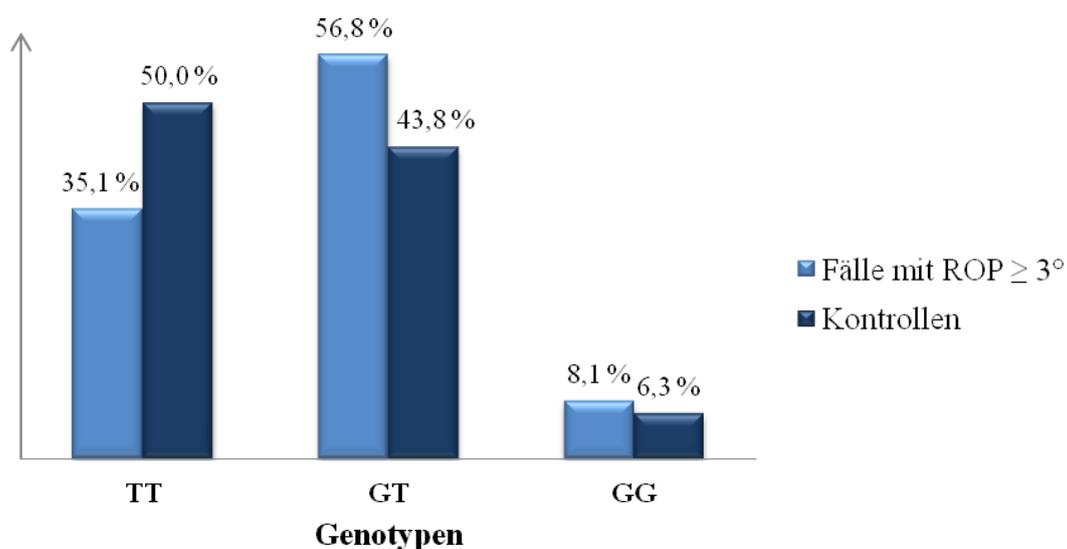


Abbildung 5.4 Genotypen des SNPs bei Patienten ohne rhEpo-Therapie. Es sind die Prozentsätze der einzelnen Genotypen von den Patienten der Fall- und Kontroll-Gruppe, jeweils ohne rhEpo-Behandlung in den ersten sechs Lebenswochen, dargestellt. Der mittels Chi-Quadrat-Test ermittelte p-Wert beträgt 0,60.

Die prozentuale Verteilung der einzelnen Genotypen verhielt sich in dieser Untersuchung gegensätzlich zu den zuvor beschriebenen Untergruppen mit rhEpo-Therapie. Hier hatten Patienten mit schwerer ROP, aber ohne rhEpo-Therapie, seltener den Genotyp TT (35,1 %). In der Kontroll-Gruppe machte dieser Anteil genau die Hälfte aus. Der heterozygote Genotyp wurde häufiger in der Fall-Gruppe beobachtet (56,8 % vs. 43,8 %). Das Ergebnis war statistisch nicht signifikant ($p = 0,60$).

Frühgeborene mit den homozygoten Genotypen TT und GG erkrankten häufiger an einer schweren ROP, wenn sie zusätzlich in den ersten sechs Lebenswochen mit rhEpo behandelt wurden (45,7 % vs. 35,1 % bzw. 11,4 % vs. 8,1 %). Der Chi-Quadrat-Test zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,50$, Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1 Genotyp-Verteilung bei Frühgeborenen mit und ohne rhEpo-Therapie. Für die statistische Analyse wurde der Chi-Quadrat-Test angewandt.

rhEpo-Therapie	ROP 0/1°			ROP ≥ 3°		
	Nein n = 16	Ja n = 54	p-Wert	Nein n = 37	Ja n = 35	p-Wert
GG , n (%)	1 (6,3)	7 (13,0)		3 (8,1)	4 (11,4)	
GT , n (%)	7 (43,8)	30 (55,6)		21 (56,8)	15 (42,9)	
TT , n (%)	8 (50,0)	17 (31,5)	0,37	13 (35,1)	16 (45,7)	0,50

5.2 Relevanz der Behandlung mit rekombinantem humanem Erythropoietin

Zur Klärung, ob rhEpo zur Prävention bzw. Behandlung der Frühgeborenenanämie einen Einfluss auf die Pathogenese der ROP hat, wurden die kumulative Dosis und der Therapiebeginn ermittelt. Den Werten in Tabelle 5.2 ist zu entnehmen, dass in der Fall-Gruppe zirka die Hälfte aller Kinder in den ersten sechs Lebenswochen zur Behandlung der Frühgeborenenanämie rhEpo erhielt. In der Kontroll-Gruppe waren es über drei Viertel aller Patienten, woraus sich ein statistisch signifikanter Unterschied ergab ($p < 0,001$). Über den Behandlungszeitraum der ersten 42 Tage fand sich bezüglich der kumulativen rhEpo-Dosis kein signifikanter Unterschied. Die Patienten beider Gruppen erhielten durchschnittlich etwa die gleiche kumulative Dosis von zirka 2200 Units/kg Körpergewicht ($p = 0,51$).

Tabelle 5.2 Analyse zur rhEpo-Therapie in der Fall-Kontroll-Studie bis zum 42. Lebenstag. Zur statistischen Analyse wurden der Chi-Quadrat-Test für die rhEpo-Therapie (%) und der Mann-Whitney-U-Test für die beiden anderen Parameter verwendet.

	ROP 0/1° n = 70	ROP ≥ 3° n = 72	p-Wert
rhEpo-Therapie, n (%)	54 (77,1)	35 (48,6)	<0,001
Therapiebeginn (Lebenstag)			
Median (Range)	9 (5 – 28)	11 (5 – 41)	0,049
Kumulative rhEpo-Dosis (Units/kg)			
Median (Range)	2155 (255 – 5180)	2170 (250 – 5180)	0,51

Die rhEpo-Therapie wurde bei Frühgeborenen mit schwerer ROP durchschnittlich zwei Tage später als bei Kontroll-Patienten initiiert (11. vs. 9. Lebenstag). In der Regel wurde die rhEpo-Therapie zwischen dem 9. und 17. Lebenstag bei den Fall- und zwischen dem 8. und 13. Lebenstag bei den Kontroll-Patienten begonnen (unteres und oberes Quartil). Die Therapie wurde in beiden Kohorten frühestens am fünften Lebenstag eingeleitet. Bei Frühgeborenen ohne schwere ROP wurde die Therapie spätestens am 28. Tag begonnen, während in der Fall-Gruppe Kinder auch noch zu einem späteren Zeitpunkt die erste rhEpo-Dosis erhielten. Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p = 0,049$). In Abbildung 5.5 ist der Zusammenhang zwischen dem Beginn der rhEpo-Therapie und der kumulativen rhEpo-Dosis anhand eines Scatterplots illustriert.

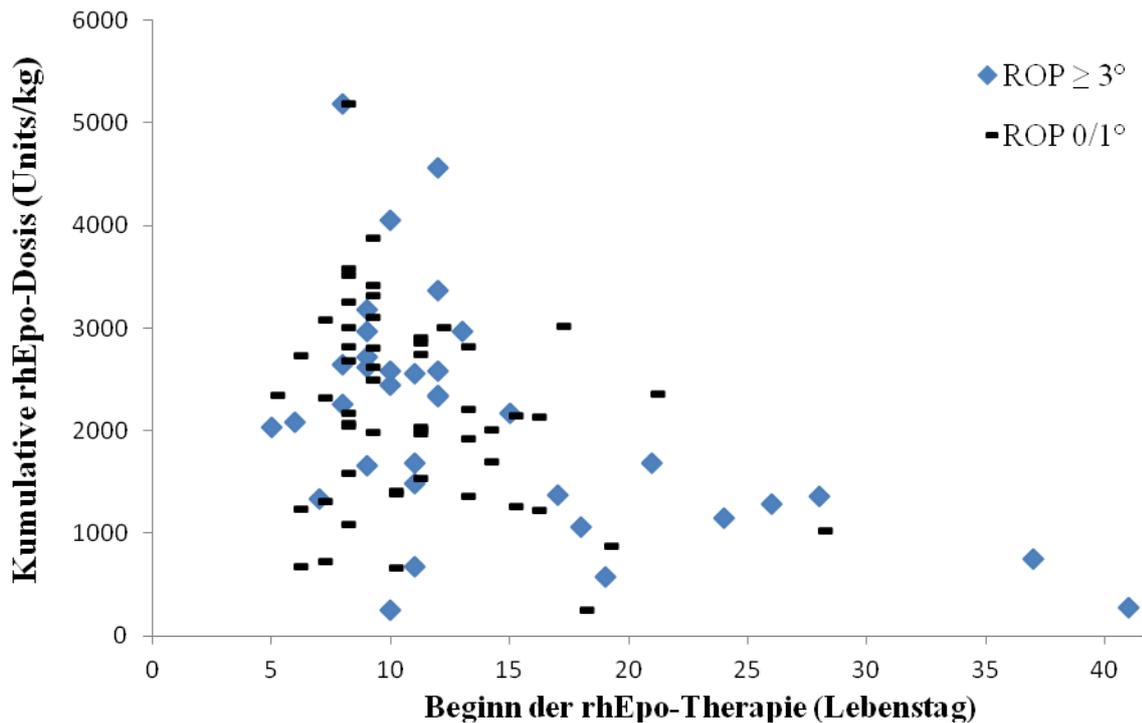


Abbildung 5.5 Analyse der Therapie der Frühgeborenenanämie mit rhEpo. Der Scatterplot stellt die Wertepaare Beginn der rhEpo-Therapie und kumulative rhEpo-Dosis jedes einzelnen Patienten der Fall- und Kontroll-Gruppe dar.

5.3 Charakteristika der Patienten der Fall-Kontroll-Studie

In den Analysen wurden 25 klinische Parameter berücksichtigt, von denen sich acht auf perinatale Ausgangsdaten bezogen. Die statistische Datenerfassung umfasste die Zeitspanne der Geburtsjahre der Frühgeborenen von Februar 1999 bis März 2009.

Die Inzidenz der schweren ROP an der Charité - Universitätsmedizin Berlin wurde mit Hilfe der Software SAP ermittelt. Es wurden nur Kinder mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g berücksichtigt. Im Zeitraum 2003 bis 2008 wurden die Frühgeborenen am CCM und CVK unter unabhängiger ärztlicher Leitung behandelt. In diesem Zeitraum wurden aus beiden Standorten Kinder mit schwerer ROP rekrutiert. Die Kinder mit schwerer ROP aus den übrigen Jahren stammen nur aus dem CVK und entsprechend wurde auch nur die Gesamtzahl der behandelten Kinder aus dem CVK verwendet. Die durchschnittliche Inzidenz der $ROP \geq 3^\circ$ betrug 3,7 % für den gesamten Beobachtungszeitraum von 1999 bis 2009.

In Tabelle 5.3 sind die wichtigsten perinatalen Ausgangsparameter der Fall- und Kontroll-Gruppe gegenübergestellt. Bei diesen Parametern fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Fall- und Kontroll-Gruppe.

Tabelle 5.3 Klinische Charakteristika der Fall- und Kontroll-Gruppe. Die Berechnung der p-Werte für das Geschlecht und die ethnische Herkunft erfolgte mit dem Chi-Quadrat-Test. Alle anderen p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt.

	ROP 0/1° n = 70	ROP ≥ 3° n = 72	p-Wert
Weibliches Geschlecht, n (%)	29 (41,4)	28 (38,9)	0,86
Geburtsgewicht (g)			
Median (Range)	739 (387 – 1120)	707 (410 – 1475)	0,23
Gestationsalter (SSW+Tage)			
Median (Range)	25+4 (23+3 – 28+2)	24+6 (23+2 – 29+5)	0,14
Körpergröße (cm)			
Median (Range)	32 (27 – 38)	32 (27 – 42)	0,53
Kopfumfang (cm)			
Median (Range)	23 (20 – 29,8)	22,5 (20 – 28)	0,12
Ethnische Herkunft (%)			
Kaukasisch	78,6	80,6	
Asiatisch	11,4	15,3	
Afrikanisch	10,0	4,2	0,35

Durchschnittlich wog ein Frühgeborenes mit schwerer ROP 707 g. Das niedrigste Geburtsgewicht betrug 410 g, und das schwerste Kind wog 1475 g. Die meisten Frühgeborenen waren extrem kleine Frühgeborene (ELBW: *extremely low birth weight*) mit einem Geburtsgewicht unter 1000 g (95,8 % Fälle bzw. 98,6 % Kontrollen). Das mittlere Gestationsalter der Frühgeborenen mit schwerer ROP betrug 24+6 SSW (Range: 23+2 bis 29+5 SSW). Nahezu die Hälfte dieser Kinder wurde vor 26 abgeschlossenen SSW geboren (51,4 %). In der Fall-Gruppe gehörten 68,1 % der Extremrisikogruppe mit einem Gestationsalter unter 26 SSW und unter 1000 g Geburtsgewicht an. Der Hochrisikogruppe mit einem Gestationsalter unter 28 SSW und unter 1500 g Geburtsgewicht ließen sich 87,5 % der Kinder mit schwerer ROP zuordnen. In Abbildung 5.6 sind die Verteilung des Gestationsalters und des Geburtsgewichts beider Gruppen und ihre Zugehörigkeit zur Extremrisiko- bzw. Hochrisikogruppe dargestellt.

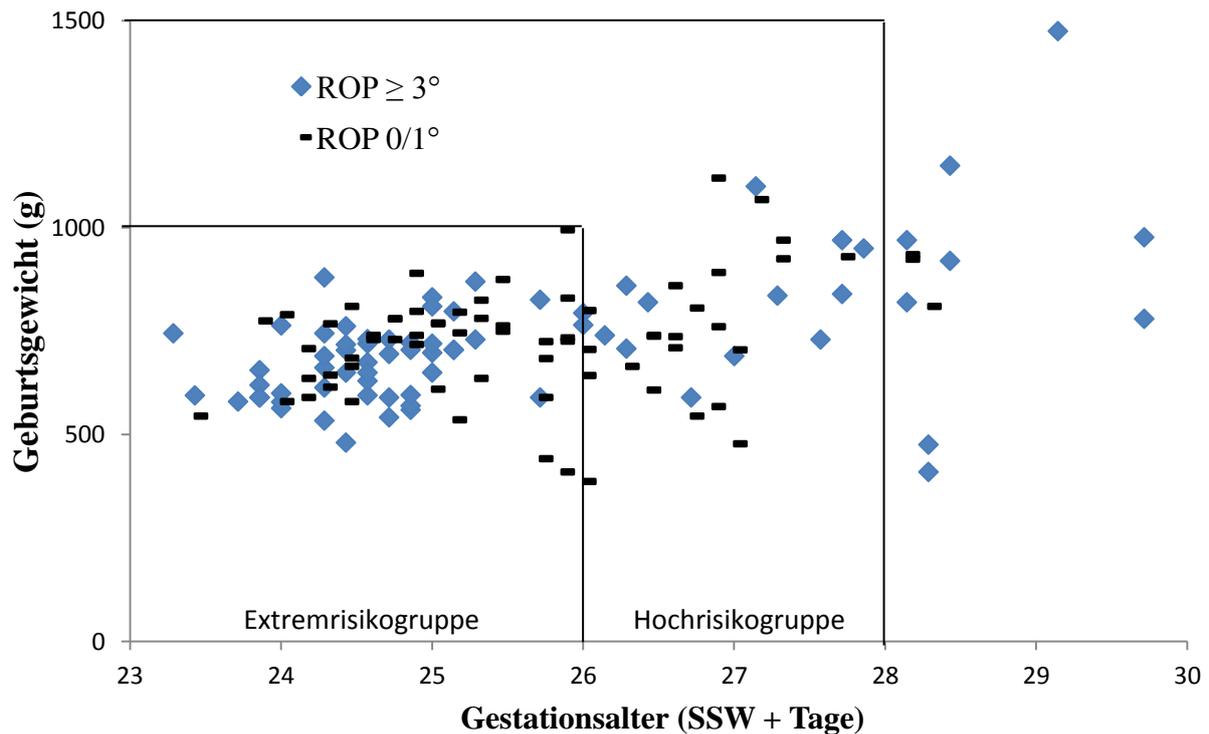


Abbildung 5.6 Geburtsgewicht und Gestationsalter. Das Scatterplot stellt die Wertepaare Gestationsalter und Geburtsgewicht der einzelnen Patienten der Fall- und Kontroll-Gruppe dar. Die Linien markieren die Extremrisikogruppe <26 SSW und <1000 g bzw. die Hochrisikogruppe <28 SSW und <1500 g.

Die Fall-Gruppe bestand mehrheitlich aus Frühgeborenen, die an einem ROP-Stadium 3 erkrankt waren (93,1 %). Die Netzhaut löste sich bei einem Patienten unvollständig und bei vier Patienten vollständig ab. Die „plus disease“ konnte bei der ophthalmologischen Untersuchung in nahezu allen erkrankten Augen der Fall-Gruppe beobachtet werden. Nur 14 % hatten keine „plus disease“. Von allen 72 Kindern der Fall-Gruppe wurden 50 mittels Laserkoagulation therapiert. Auch die Kryotherapie wurde im Beobachtungszeitraum teilweise noch an der Charité eingesetzt. Zwischen 2001 und 2005 wurde bei drei Kindern zusätzlich zur Laserkoagulation auch die Kryotherapie angewandt. Mit Ausnahme von fünf Kindern (ROP-Stadium 1) war kein Frühgeborenes der Kontroll-Gruppe an einer ROP erkrankt.

Ferner wurden typische Risikofaktoren für die schwere ROP analysiert. Dazu zählen das männliche Geschlecht, Zwillinge und die kaukasische Herkunft. Es zeigte sich, dass männliche Frühgeborene tatsächlich häufiger (61,1 %) von einer schweren ROP betroffen waren. Weiterhin waren 13 von 72 Frühgeborenen der Fall-Gruppe Mehrlinge (18,1 %), bei denen beide Zwillinge bzw. alle drei Drillinge an einer schweren ROP erkrankten. In der Kontroll-Gruppe waren nur vier Kinder Mehrlinge (5,7 %). Dies ergab mit Hilfe des Chi-

Quadrat-Tests einen statistisch signifikanten Unterschied. Darüber hinaus erkrankten kaukasische Kinder häufiger an einer schweren ROP (80,6 %). Ein nahezu gleich großer Anteil an Kindern aus der Kontrollegruppe war ebenfalls kaukasischer Herkunft. Die zweitgrößte Population waren sowohl in der Fall- als auch in der Kontroll-Gruppe asiatische Patienten. Nur drei Kinder mit schwerer ROP waren dunkelhäutig (4,2 %). Dahingegen hatte jedes zehnte Kind aus der Kontroll-Gruppe eine dunkle Hautfarbe (10,0 %). Diese Unterschiede zwischen Patienten der Fall- und Kontroll-Gruppe waren statistisch nicht signifikant.

5.4 Assoziation mit Erkrankungen des Frühgeborenen

Bei den Erkrankungen des Frühgeborenen stellte der PDA die häufigste Diagnose dar, er wurde in der Fall- und Kontroll-Gruppe annähernd gleich häufig diagnostiziert (Tabelle 5.4).

Tabelle 5.4 Inzidenz von PDA, ICH und NEC bei den Patienten der Fall-Kontroll-Studie. Für die statistische Analyse bezüglich der NEC wurde der exakte Test nach Fisher benutzt, weil die erwartete Häufigkeit kleiner als fünf war. Die anderen p-Werte wurden mit dem Chi-Quadrat-Test berechnet.

	ROP 0/1°	ROP ≥ 3°	p-Wert
Persistierender <i>Ductus arteriosus</i>, n (%)	60 (85,7)	57 (79,2)	0,38
Intrakranielle Hämorrhagie, n (%)	9 (12,9)	33 (45,8)	<0,001
Nekrotisierende Enterokolitis, n (%)	1 (1,4)	5 (6,9)	0,21

Eine ICH wurde mehr als dreimal so häufig bei Kindern mit schwerer ROP im Vergleich zur Kontroll-Gruppe festgestellt ($p < 0,001$). An einer NEC erkrankten ein Kind der Kontroll-Gruppe und fünf Kinder der Fall-Gruppe.

5.5 Behandlungsparameter

Ferner wurden klinische Behandlungen in die Analysen einbezogen, die nach der aktuellen Literatur mit einem erhöhten ROP-Risiko assoziiert sein können.

5.5.1 Sauerstofftherapie und Beatmung

Neben der Unreife des Frühgeborenen stellt die Sauerstofftherapie einen entscheidenden Risikofaktor für die Entwicklung der ROP dar. Alle an schwerer ROP erkrankten Kinder wurden in den ersten sechs Lebenswochen mit einer Sauerstoffsupplementierung behandelt. Ähnliches konnte in der Kontroll-Gruppe beobachtet werden. Drei Kinder aus der Kontroll-Gruppe erhielten keinen zusätzlichen Sauerstoff. Für die relative Häufigkeit der Sauerstofftherapie ergab sich kein signifikanter Unterschied (Tabelle 5.5). Ebenfalls wurde kein statistisch signifikanter Unterschied für die Dauer der Sauerstofftherapie innerhalb der ersten 42 Tage festgestellt. Die Mehrzahl der Patienten aus beiden Gruppen erhielt aber über den gesamten Analysezeitraum von 42 Tagen eine Sauerstofftherapie (Fälle 77,8 %, Kontrollen 70,0 %). Zusätzlich wurde die höchste FiO_2 ermittelt, die einem Kind während der ersten sechs Lebenswochen zugeführt wurde. Zwei Drittel aller Kinder aus der Fall-Gruppe bekamen Sauerstoff bis zu einer maximalen FiO_2 von 1,0 appliziert. In der Regel wurden solche hohen Sauerstoffkonzentrationen nur über eine kurze Zeitspanne verabreicht. In der Kontroll-Gruppe wurde ein FiO_2 von 1,0 signifikant seltener appliziert (45,7%, $p = 0,03$).

Tabelle 5.5 Sauerstofftherapie und Beatmung in der Fall- und Kontroll-Gruppe. Der Beobachtungszeitraum reicht bis Tag 42. Für die Ermittlung eines signifikanten Unterschiedes bezüglich der Parameter Sauerstofftherapie (%) und Beatmung (%) wurde der exakte Test nach Fisher verwendet. Der p-Wert für die Anwendung einer maximalen inspiratorischen Sauerstoffkonzentration von FiO_2 1,0 (%) wurde mit dem Chi-Quadrat-Test ermittelt. Für die Dauer der Sauerstofftherapie und Beatmung ist der Median (Range) angegeben. Die beiden p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet.

	ROP 0/1° n = 70	ROP ≥ 3° n = 72	p-Wert
Sauerstofftherapie, n (%)	67 (95,7)	72 (100)	0,12
Dauer der Sauerstoffzufuhr (Tage)	42 (0 – 42)	42 (1 – 42)	0,12
Max. $\text{FiO}_2 = 1,0$ (%)	45,7	65,3	0,03
Beatmung, n (%)	67 (95,7)	70 (97,2)	0,68
Dauer des Beatmung (Tage)	15 (1 – 42)	35 (1 – 42)	<0,001

Wie bereits beschrieben wurden Frühgeborene mit $\text{ROP} \geq 3^\circ$ häufiger beatmet als Kinder mit $\text{ROP} < 2^\circ$. Ein statistisch signifikanter Unterschied ergab sich auch hinsichtlich der Dauer der Beatmung ($p < 0,001$). Frühgeborene mit schwerer ROP wurden durchschnittlich fast doppelt so lange beatmet (Median: 35 Tage) wie Kinder der Kontroll-Gruppe (Median: 15 Tage, Range: 1-42 Tage, wobei Tag 42 der letzte Tag des Beobachtungszeitraums war).

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass nahezu alle Patienten aus der Fall- und der Kontroll-Gruppe eine Beatmungs- und Sauerstofftherapie erhielten, jedoch von unterschiedlicher Therapiedauer: Kinder mit schwerer ROP wurden länger beatmet.

5.5.2 Parenterale Ernährung und Steroide

Frühgeborene mit schwerer ROP wurden durchschnittlich sechs Tage länger teilparenteral ernährt ($p = 0,001$). In beiden Gruppen fanden sich jedoch Frühgeborene, die während der gesamten ersten sechs Lebenswochen teilparenteral ernährt wurden.

In der Studienpopulation wurde ungefähr jedes dritte Frühgeborene mit schwerer ROP wegen einer Bronchopulmonalen Dysplasie mit fortgesetztem Beatmungsbedarf mit Glukokortikoiden behandelt. In der Kontroll-Gruppe erhielten nur sechs Kinder Glukokortikoide; dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p < 0,001$). Die Dauer der Steroidtherapie war bei Patienten mit schwerer ROP etwas länger als in der Kontroll-Gruppe (9 vs. 7 Tage, $p = 0,05$).

Tabelle 5.6 Parenterale Ernährung und Steroide in der Fall- und Kontroll-Gruppe. Der Beobachtungszeitraum reicht bis Tag 42. Der p-Wert für die relative Häufigkeit der Glukokortikoid-Therapie wurde mit dem Chi-Quadrat-Test und die anderen beiden p-Werte mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet.

	ROP 0/1°	ROP ≥ 3°	p-Wert
Parenterale Ernährung (Tage)	17 (4 – 42)	23 (8 – 42)	0,001
Glukokortikoide , n (%)	6 (8,6)	28 (38,9)	<0,001
Glukokortikoide (Tage)	7 (4 – 7)	9 (1 – 23)	0,05

5.5.3 Bluttransfusionen und Eisensupplementierung

Ferner wurde die Assoziation der ROP mit den Risikofaktoren Erythrozytentransfusion und Eisensupplementierung analysiert.

Aus Tabelle 5.7 wird ersichtlich, dass beinahe jedes Kind der Fall-Gruppe (95,8 %) in den ersten sechs Lebenswochen mindestens eine Erythrozytentransfusion erhielt. Auch in der Kontroll-Gruppe wurden die meisten Patienten transfundiert (87,1 %). Eine Erythrozytentransfusion wurde signifikant häufiger bei Frühgeborenen mit schwerer ROP verabreicht als bei Kontroll-Patienten ($p < 0,001$). Im Durchschnitt erhielt ein Kind der Fall-Gruppe in den

ersten 42 Tagen sechs Erythrozytentransfusionen. In der Kontroll-Gruppe waren es in diesem Zeitraum nur drei. Frühgeborenen mit schwerer ROP wurde ein signifikant höheres Volumen an Erythrozytenkonzentrat (EK) pro Kilogramm Körpergewicht transfundiert. Kinder mit schwerer ROP bekamen durchschnittlich zwei Tage früher das erste EK transfundiert ($p < 0,01$).

Tabelle 5.7 Behandlung der Frühgeborenenanämie und Eisensupplementierung. Der Beobachtungszeitraum reicht bis Tag 42. Der Chi-Quadrat-Test wurde zur Ermittlung des p-Wertes für die relative Häufigkeit von Erythrozytentransfusion verwendet. Für alle anderen Parameter wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt und der Median (Range) angegeben.

	ROP 0/1°	ROP ≥ 3°	p-Wert
Transfundierte Kinder , n (%)	61 (87,1)	69 (95,8)	0,08
Erste Erythrozytentransfusion (Lebenstag)	4 (1 – 40)	2 (1 – 29)	<0,01
Anzahl Transfusionen , n	3 (1 – 8)	6 (1 – 13)	<0,001
Transfusionsvolumen (ml/kg)	45 (15 – 105)	90 (15 – 195)	<0,001
Eisensupplementierung (mg/kg)	174 (12 – 357)	147 (6 – 228)	<0,01

Die Abbildung 5.7 veranschaulicht den Zusammenhang zwischen der Anzahl der Erythrozytentransfusionen und dem Therapiebeginn. Eine Linie unterscheidet die erste Phase (< Tag 8), in der Transfusionen zumeist aufgrund zahlreicher Blutentnahmen erfolgen, von der Phase 2 der „klassischen“ Frühgeborenenanämie (Tage 8-42). Die Analyse zeigt, dass 84,1 % der EKs in der Fall-Gruppe und 67,2 % der EKs in der Kontroll-Gruppe vor Tag 8 transfundiert wurden ($p = 0,03$).

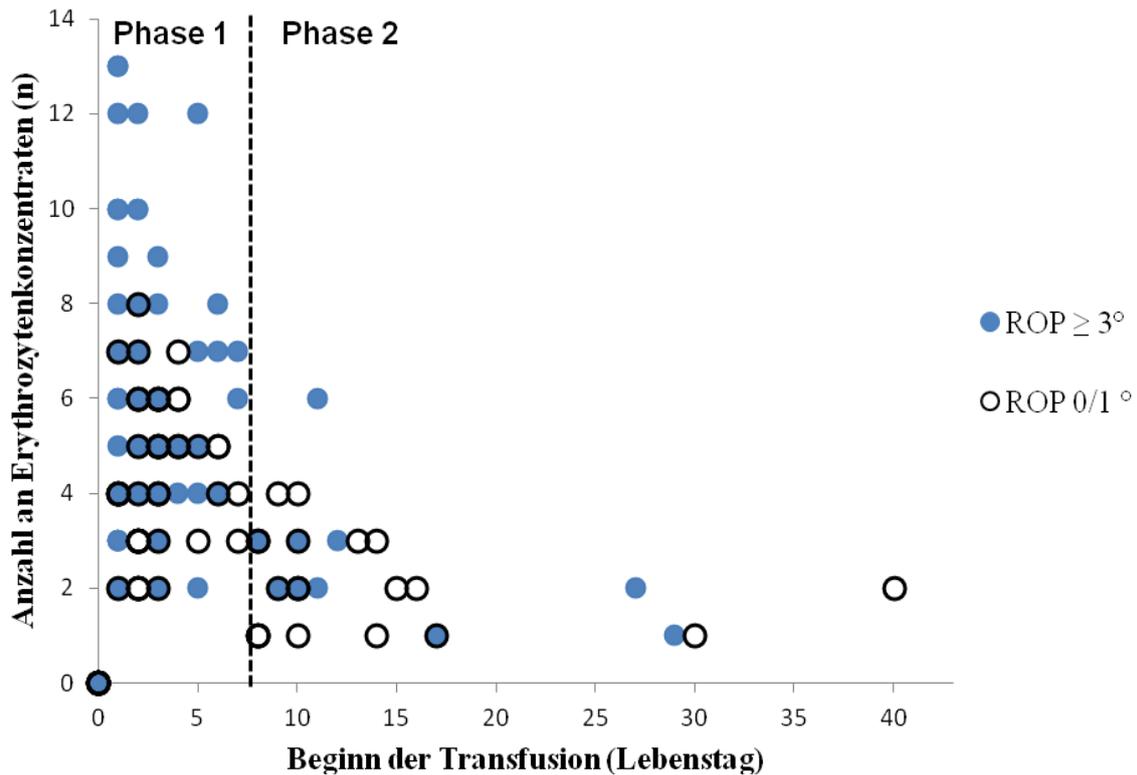


Abbildung 5.7 Zeitpunkt der Erythrozytentransfusion in der Fall- und Kontroll-Gruppe. Es ist ein Scatterplot bestehend aus dem Beginn der Erythrozytentransfusion auf der x-Achse und der Anzahl der Erythrozytenkonzentrate auf der y-Achse dargestellt. Die Phase 1 repräsentiert Transfusionen, die typischerweise aufgrund zahlreicher Blutentnahmen erforderlich sind, und die Phase 2 solche, die zur Behandlung der Frühgeborenenanämie nötig werden.

In der Literatur wird die Eisensupplementierung als unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung der ROP diskutiert. In der Analyse der beiden Kohorten stellte sich heraus, dass Frühgeborenen mit schwerer ROP signifikant geringere kumulative Eisenmengen zugeführt wurden (147 vs. 174 mg/kg Körpergewicht, $p < 0,01$). Kinder mit schwerer ROP hatten nicht nur weniger Eisen in den ersten sechs Lebenswochen, sondern auch seltener überhaupt eine Eisensupplementierung erhalten. In der Fall-Gruppe wurde nur bei etwa 76,3 % der Kinder eine Eisen-Therapie in der Akte dokumentiert (Kontroll-Gruppe: 95,7 %).

Abschließend fasst Tabelle 5.8 die Behandlungsparameter der Frühgeborenenanämie in Abhängigkeit von einer möglichen rhEpo-Therapie in der jeweiligen Fall- bzw. Kontroll-Gruppe zusammen. Dabei bestätigen sich signifikante Unterschiede innerhalb der Fall- bzw. Kontroll-Gruppe bezüglich der Anzahl an EKs, des Transfusionsvolumens und der Eisensupplementierung. Frühgeborene beider Gruppen mit rhEpo-Behandlung benötigten signifikant weniger Transfusionen und ein geringeres Transfusionsvolumen, bekamen jedoch signifikant mehr Eisen supplementiert.

Tabelle 5.8 Charakteristika der Behandlung der Frühgeborenenanämie. Der Chi-Quadrat-Test wurde zur Ermittlung eines signifikanten Unterschiedes für die mit Erythrozytenkonzentrat transfundierten Kinder n (%) angewendet. Bei allen übrigen Parametern wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet und der Median (Range) angegeben.

rhEpo-Therapie	ROP 0/1°			ROP ≥ 3°		
	Nein n = 16	Ja n = 54	p-Wert	Nein n = 37	Ja n = 35	p-Wert
Geburtsgewicht (g)	718 (545 - 830)	745 (387 - 1120)	0,09	731 (410 - 1150)	698 (481 - 1475)	0,08
Gestationsalter (SSW+Tage)	25+0 (23+3 - 26+6)	25+5 (23+6 - 28+2)	0,14	25+1 (23+2 - 29+5)	24+6 (23+6 - 29+5)	0,11
Transfundierte Kinder, n (%)	16 (100)	45 (83,3)	0,08	36 (97,3)	33 (94,3)	0,48
Erste Erythrozytentransfusion (Lebenstag)	4 (2 - 10)	5 (1 - 40)	0,55	2 (1 - 29)	3 (1 - 12)	0,23
Anzahl an Transfusionen, n	6 (1 - 8)	3 (1 - 7)	<0,001	7 (1 - 13)	5 (2 - 12)	0,01
Transfusionsvolumen (ml/kg)	83 (15 - 105)	45 (15 - 105)	<0,001	98 (15 - 195)	75 (30 - 180)	0,01
Eisensupplementierung (mg/kg)	93 (12 - 219)	188 (69 - 357)	<0,001	90 (6 - 178)	164 (60 - 228)	<0,001

6. Diskussion

In dieser Arbeit sollten drei Fragstellungen untersucht werden, die nachfolgend im Detail diskutiert werden:

- 1) Korreliert das Auftreten einer schweren ROP bei Frühgeborenen mit dem *EPO*-SNP rs1617640 wie zuvor bei Erwachsenen mit PDR beschrieben?
- 2) Gibt es einen Zusammenhang zwischen schwerer ROP und Gabe von rhEpo in Abhängigkeit vom Vorliegen des *EPO*-SNPs rs1617640?
- 3) Bestätigen sich typische Risikofaktoren für die Entwicklung einer schweren ROP in der eigenen Fall-Kontroll-Studie?

6.1 Assoziationsstudien zum SNP rs1617640 bei Erkrankungen des Erwachsenen

Die Hypothese, dass der SNPs rs1617640 mit dem Auftreten schwerer ROP assoziiert ist, bestätigte sich in dieser retrospektiven Fall-Kontroll-Studie nicht. Nach der aktuellen Literatur haben bislang acht Arbeitsgruppen bei Erwachsenen Assoziationsstudien zum SNP rs1617640 durchgeführt. Davon beziehen sich vier Studien auf die proliferative diabetische Retinopathie.

6.1.1 Assoziationsstudien bei proliferativer diabetischer Retinopathie

Die Häufigkeitsverteilung des SNPs rs1617640 in unserer Fall-Kontroll-Studie ähnelt den Studiengruppen Erwachsener mit diabetischer Retinopathie wie von Tong *et al.* beschrieben. Analog zu den Patienten mit PDR waren Frühgeborene mit schwerer ROP häufiger Träger eines Risiko-Allels T als Patienten der Kontroll-Gruppe. In der statistischen Auswertung ließ sich hierfür aber kein signifikanter Unterschied feststellen. Eine mögliche Ursache könnte in der Fallzahl von 142 Patienten liegen. Die Studie von Tong *et al.* umfasst insgesamt 2572 Probanden. Andererseits hat die hier vorgestellte Fall-Kontroll-Population aufgrund der geringen relativen Häufigkeit extremer Frühgeburtlichkeit und gleichzeitigem Zugang zu geeignetem Untersuchungsmaterial einen sehr hohen Stellenwert, zumal das Studiendesign u.a. mit Analyse der medikamentösen, adjuvanten rhEpo-Therapie als sehr günstig und gut begründet zu bewerten ist.

Im Gegensatz zur eigenen Untersuchung bei Frühgeborenen kann die Studie von *Tong et al.* gut mit Studienpopulationen verglichen werden, bei denen ebenfalls die Relevanz des *EPO*-SNPs rs1617640 im Rahmen der diabetischen Retinopathie analysiert wurde [98, 99, 100]. Diese Studien unterscheiden sich jedoch in einigen wichtigen Details.

In der Studie von *Tong et al.* haben alle Patienten der Fall-Gruppe neben der PDR auch eine dokumentierte diabetische Nephropathie. Bei der Mehrheit der Patienten lag bereits eine terminale Niereninsuffizienz (ESRD: *end-stage renal disease*) vor. In die Kontroll-Gruppe wurden Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 oder 2, jedoch ohne diabetische Retinopathie und Nephropathie eingeschlossen. Interessanterweise konnte in genomweiten Analysen gezeigt werden, dass der Chromosomenabschnitt 7q21, in welchen sich auch das *EPO*-Gen befindet, mit einer erhöhten Anfälligkeit für eine diabetische Nephropathie assoziiert ist. Insofern könnte der Genotyp TT auch die Entstehung einer diabetischen Nephropathie begünstigen [101]. Dieser Frage wurde zwei Jahre später in der Studie von *Abhary et al.* nachgegangen [98]. Der wesentliche Unterschied dieser Fall-Kontroll-Studie bestand darin, dass alle Patienten mit einer ESRD von der Untersuchung des SNPs ausgeschlossen wurden. Die Studie wies tatsächlich einen statistisch signifikanten Unterschied im Vorkommen des SNPs rs1617640 zwischen Patienten mit (16,5 %) und ohne (9,6 %) diabetische Retinopathie nach ($p = 0,01$). Im Gegensatz zu *Tong et al.* identifizierten die Autoren jedoch den Genotyp GG als genetische Prädisposition für die diabetische Retinopathie (Tabelle 6.1).

Tabelle 6.1 Assoziationsstudien des *EPO*-SNP rs1617640. Alle Studien haben als klinisches Einschlusskriterium für die Fall-Gruppe eine proliferative diabetische Retinopathie. In der Studie von *Tong et al.* sind die Patienten der Fall-Gruppe zusätzlich an einer diabetischen Nephropathie erkrankt. Die Fallzahlen sind als absolute Häufigkeiten und die Genotypen als relative Häufigkeiten in Prozent angegeben.

Studie	Fallzahl	Fall-Gruppe			Kontroll-Gruppe			p-Wert
		TT	GT	GG	TT	GT	GG	
Studienpopulation ROP	142	40,3	50,0	9,7	35,7	52,8	11,4	0,86
Studienpopulationen PDR								
Tong et al. [45]	2572	38,6	47,7	13,8	26,1	53,7	20,2	<0,001
Abhary et al. [98]	500	38,6	44,9	16,5	38,6	51,8	9,6	0,01
Song et al. [99]	782	66,0	31,1	2,9	66,6	29,0	4,4	>0,05
Balasubbu et al. [100]	704	9,0	47,4	43,6	8,4	47,7	43,9	0,89

Nachfolgend wurde in zwei weiteren Studien die Assoziation des SNPs rs1617640 mit der PDR untersucht. Die Autoren Song *et al.* und Balasubbu *et al.* konnten keine Assoziation des SNPs mit der diabetischen Retinopathie nachweisen ($p > 0,05$ bzw. $p = 0,89$). Bei den Patientenkollektiven handelte es sich um eine chinesische bzw. um eine indische Kohorte [99, 100], während Tong *et al.* ausschließlich Kaukasier untersucht hatten [45]. Die ethnische Herkunft könnte Einfluss auf die Assoziation haben.

Molekulargenetische Analysen können für ein und denselben SNP unterschiedliche Risiko-Allele identifizieren. Hierfür gibt es unterschiedliche Erklärungen. Zum einen können die Ergebnisse bei verschiedenen ethnischen Gruppen und zusätzlich bei spezieller Lebensweise unterschiedlich ausfallen [102]. Zum anderen ist in der Ätiologie komplexer Krankheiten oft das Zusammenspiel verschiedener Genloci relevant [103].

Um den tatsächlichen Effekt des SNPs rs1617640 auf die diabetische Retinopathie besser einschätzen zu können, wurde das kumulative Ergebnis der Studien von Tong *et al.*, Abhary *et al.*, Song *et al.* und Balasubbu *et al.* berechnet (Tabelle 6.2). Mit der Gesamtstichprobe von 4558 Patienten bestätigte sich sowohl die Assoziation des Genotyps TT mit der diabetischen Retinopathie als auch der protektive Effekt des Genotyps GG.

Tabelle 6.2 Assoziation des SNP rs1617640 in allen vier Fall-Kontroll-Studien mit proliferativer diabetischer Retinopathie. OR = Odds ratio. 95%CI = 95%-Konfidenzintervall.

	Fälle	Kontrollen	OR	95%CI	p-Wert
TT	1053	592			
GT/GG	1626	1287			
	2679	1879	1,408	1,241-1,598	< 0,001

	Fälle	Kontrollen	OR	95%CI	p-Wert
GG	431	388			
GT/TT	2248	1491			
	2679	1879	0,737	0,631-0,860	< 0,001

6.1.2 Assoziation des *EPO*-SNPs rs1617640 mit anderen Erkrankungen

Derzeit liegen vier weitere Studien vor, die eine Assoziation des SNP rs1617640 mit anderen Erkrankungen analysierten.

Popov *et al.* konnten zeigen, dass Patienten mit dem Genotyp TT nach Kardiochirurgie mit Herz-Lungen-Maschine mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit eine Nierenersatztherapie benötigten ($p < 0,01$) [104]. Die Autoren diskutieren einen möglichen Zusammenhang mit der erhöhten Epo-Konzentration durch den Genotyp TT, da die Therapie mit rhEpo zu thromboembolischen Ereignissen führen kann [105].

Eine weitere Studie prüfte, ob der SNP rs1617640 mit Veränderungen der Epo-Konzentration beim Myelodysplastischen Syndrom (MDS) assoziiert ist [106]. Dies konnte bestätigt werden, denn Patienten mit einem MDS zeigten signifikant häufiger den Genotyp GG als die Kontroll-Gruppe ($p < 0,001$). Es wird vermutet, dass beim Genotyp GG niedrige Epo-Konzentrationen die normale Reifung hämatopoetischer Zellen stören.

Khabour *et al.* konnten keinen Effekt des SNPs rs1617640 auf die Epo-Konzentration im Serum nachweisen [107]. Jedoch konnten sie zeigen, dass das G-Allel signifikant häufiger bei Blutspendern mit einem Hämatokrit von über 48 % als bei Blutspendern mit einem Hämatokrit zwischen 42 und 47,5 % vorkam.

In einer Studie bei Patienten mit chronischer Schizophrenie hatten Träger der Genotyp-Kombination GG im SNP rs1617640 sowie von 21 bis 35 Wiederholungen der Dinukleotide GA (Mikrosatelliten) im Promotor des *EPOR*-Gens eine deutlich bessere kognitive Leistungsfähigkeit [108]. Kästner *et al.* vermuten, dass eine erhöhte Epo-Konzentration die kognitive Leistungsfähigkeit steigert.

Aktuelle klinische Phase II/III Studien untersuchen die Relevanz von hochdosiertem rhEpo auf das neurokognitive *Outcome* von VLBW-Frühgeborenen [109, 110, 111, 112, 113, 114]. Allerdings waren in diesen Studien nach den Studieninformationen, die über www.clinicaltrials.org zugänglich sind (u.a. NCT #01378273), molekulare Untersuchungen von Varianten des *EPO*- oder des *EPOR*-Gens nicht vorgesehen.

6.2 ROP-Risiko unter rhEpo-Therapie

Die Ergebnisse der eigenen Studie erlauben erstmals, das mögliche Risiko der rhEpo-Behandlung für die Entwicklung einer höhergradigen ROP unter der Berücksichtigung einer eventuellen genetischen Prädisposition durch den SNP rs1617640 zu beurteilen.

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass wiederholte rhEpo-Gaben zur Behandlung der Frühgeborenenanämie mit einem erhöhten ROP-Risiko assoziiert sind [60, 61]. Im Jahr 2012 wurde in einer Cochrane-Metaanalyse ein statistisch signifikant erhöhtes Risiko für eine ROP $\geq 3^\circ$ nach früher rhEpo-Behandlung (Beginn vor dem achten Lebenstag) errechnet [16]. Zwei Jahre später aktualisierten die Autoren die Metaanalyse, weil die Studie von Romagnoli *et al.* zuvor fälschlicherweise der frühen rhEpo-Therapie zugerechnet wurde, obwohl die Behandlung im Mittelwert erst am 10. (± 1) Lebenstag begonnen wurde [17]. Um zu überprüfen, ob der SNP rs1617640 unter Behandlung mit rhEpo für eine schwere ROP prädisponiert, wurde eine Subgruppenanalyse durchgeführt. Tatsächlich ist ein *Cut-off* von ≤ 7 Tagen für die Definition eines frühen Beginns bzw. von > 7 Tagen für den späten Beginn einer rhEpo-Behandlung willkürlich gewählt, zumal die sogenannte Latenzphase (Phase 1) in der Pathophysiologie der ROP etwa 14 Tage dauert (Abbildung 1.1) [23]. In den nach Erkennen des Fehlers aktualisierten Cochrane-Metaanalysen konnte zwar ein Trend, jedoch keine statistische Evidenz mehr festgestellt werden, nach der ein früher oder später Beginn der rhEpo-Behandlung mit einem gesteigerten Risiko für eine höhergradige ROP assoziiert ist [16, 115]. Nach einer aktuellen Literaturdurchsicht erscheinen diese beiden Analysen ergänzungs- und aktualisierungswürdig.

Sowohl die Patienten der Fall- als auch der Kontroll-Gruppe bekamen ihre erste rhEpo-Dosis durchschnittlich nach dem achten Lebenstag appliziert. Tatsächlich ist in der Fall-Kontroll-Studie die rhEpo-Therapie auch bei Vorliegen des Risikoallels T der Erwachsenengruppe mit PDR bei Frühgeborenen nicht mit einem erhöhten ROP-Risiko assoziiert. Dabei wurde in beiden Gruppen nahezu die gleiche kumulative Dosis verabreicht. Im Gegensatz zu den meisten Studien wurde bei Frühgeborenen mit schwerer ROP sogar seltener als in der Kontroll-Gruppe eine rhEpo-Therapie angeordnet. Die vom SNP rs1617640 geschaffenen putativen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie TAL1 und die gleichzeitige exogene rhEpo-Zufuhr haben demnach keinen kumulativen Effekt auf die Vaskularisation der Retina ($p = 0,19$, Abbildung 6.1).

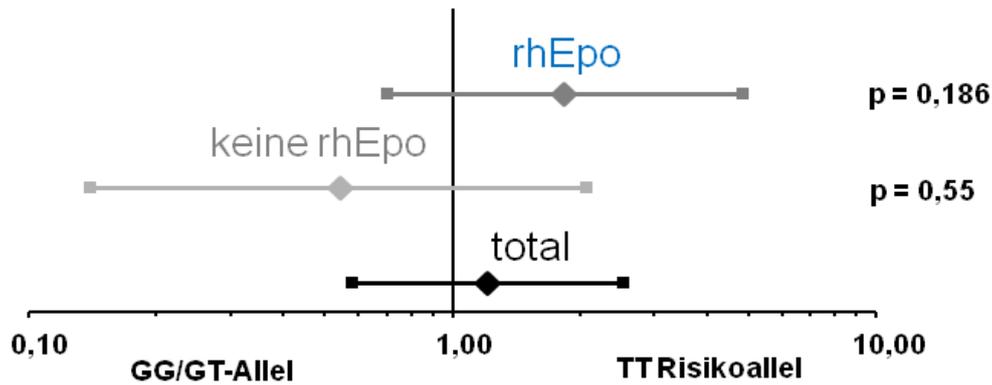


Abbildung 6.1 TT als Risikoallel für schwere ROP bei später rhEpo-Therapie. Es ist die Odds Ratio mit dem 95%-Konfidenzintervall bei Patienten mit und ohne rhEpo-Therapie sowie für das gesamte Patientenkollektiv dargestellt.

Interessanterweise hat bei Mäusen eine erhöhte Epo-Konzentration im Auge in der Phase 1 (Initiierung) der ROP eine protektive Wirkung, indem es vor hyperoxisch-bedingten Vasoobliterationen schützt und zudem neuroprotektiv wirken kann [69, 74, 116]. Somit lässt sich die Hypothese aufstellen, dass erhöhte Epo-Konzentrationen - im Gegensatz zur PDR - in den ersten Lebenstagen das ROP-Risiko senken. Die höhere endogene Epo-Konzentration im Auge beim Genotyp TT könnte schon von Beginn an die pathologischen Prozesse der ROP an der Retina hemmen. Dies kann jedoch nicht aus einer Fall-Kontroll-Studie hergeleitet werden, sondern erfordert weiterführende grundlagenwissenschaftliche Untersuchungen.

6.3 Überprüfung anderer Risikofaktoren für die Entstehung einer ROP

Inzidenz

Die Inzidenz der höhergradigen Retinopathie liegt gemäß der Zahlen des Instituts für angewandte Qualitätsförderung und Forschung im Gesundheitswesen bundesweit bei 3,32 % [2]. In der Gesamtkohorte der Charité, aus welcher die Fall- und Kontrollpatienten ausgewählt wurden, lag die Inzidenz der ROP $\geq 3^\circ$ über den Zeitraum von Geburtsjahr 1999 bis 2009 mit 3,7 % ähnlich hoch. Eine retrospektive Reevaluation der ophthalmologischen Befunde war nicht möglich, da sie nicht fotografisch, sondern nur schriftlich dokumentiert wurden. Wünschenswert wäre zukünftig eine sog. *Red Cam* zur unabhängigen Dokumentation der Retinae zu verwenden, um anhand der Fotos auch retrospektiv Aussagen treffen zu können [117].

Dennoch erscheinen die Zahlen ausreichend robust, um weitere Risikofaktoren für die Entstehung der ROP $\geq 3^\circ$ zu analysieren. Dazu zählen das Geburtsgewicht und das

Gestationsalter [12]. Das durchschnittliche Geburtsgewicht eines Frühgeborenen mit schwerer ROP beträgt in der vorliegenden Studie 707 g. Damit entspricht die Studienpopulation der anderer großer Studien. Zu den bekanntesten und umfangreichsten Studien zählt die CRYO-ROP-Studie, in welcher 4099 Kinder augenärztlich untersucht wurden. Im Durchschnitt wogen Kinder mit einer „*threshold disease*“ dort 800 g [34]. Das niedrige Geburtsgewicht und niedrige Gestationsalter der Studienpopulation ist deshalb repräsentativ und zur Beantwortung der Fragestellungen geeignet. Durch die stratifizierte Randomisierung des Gestationsalters und Geburtsgewichtes konnte ausgeschlossen werden, dass das ROP-Risiko durch eine intrauterine Wachstumsretardierung und die damit verbundenen Störungen im IGF-1-Stoffwechsel beeinflusst wurde.

Patientencharakteristika

Die Risikofaktoren männliches Geschlecht, kaukasische Herkunft und Mehrling spiegeln sich ebenfalls in der vorliegenden Fall-Kontroll-Studie wider (Tabelle 5.3).

Erkrankungen des Frühgeborenen

Die ROP reflektiert die Unreife und vor allem die Schwere der Erkrankungen des Frühgeborenen. Kinder mit einer ROP haben häufiger ein Atemnotsyndrom, rezidivierende, schwere Apnoen, eine Sepsis, die hämodynamischen Folgen eines PDA, eine NEC sowie eine ICH durchgemacht [118]. Auch in der eigenen Arbeit wurde bei den meisten Patienten mit schwerer ROP zusätzlich ein PDA und oftmals eine ICH diagnostiziert. Jedoch wurde bei den Patienten der Kontroll-Gruppe ebenso häufig ein PDA diagnostiziert. Dies ist naheliegend, da beide Gruppen durch die stratifizierte Randomisierung ähnlich unreif sind. Die von Kumar *et al.* gezeigte Assoziation der ICH mit der ROP fand sich auch in der vorliegenden Fall-Kontroll-Studie. Bezüglich der NEC gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen (siehe Tabelle 5.4).

Sauerstoffexposition

In vielen Studien wurde die Sauerstoffexposition als entscheidender Risikofaktor für die Entwicklung einer ROP beschrieben. Dabei korrelieren eine erhöhte inspiratorische Sauerstoffkonzentration, eine erhöhte arterielle Sauerstoffsättigung, eine lange Sauerstoffzufuhr, eine Beatmung und der häufige Wechsel zwischen Hyperoxie und Hypoxie mit dem Erkrankungsrisiko. Die inspiratorische Sauerstoffkonzentration sowie die Dauer der

Beatmung konnten auch in dieser Fall-Kontroll-Studie als Risikofaktor für eine höhergradige ROP bestätigt werden. In beiden Studienpopulationen hatten nahezu alle Patienten eine Sauerstofftherapie erhalten. Die Zufuhr von Sauerstoff stellt somit per se keinen isolierten Risikofaktor dar. Es ließ sich jedoch ein signifikanter Unterschied bezüglich der FiO_2 von 1,0 feststellen. Trotz der stratifizierten Randomisierung könnte die häufigere Anwendung eines FiO_2 von 1,0 Ausdruck schwererer Erkrankungen in der Fall-Gruppe sein. Dies ist gut vereinbar mit einem größeren, statistisch signifikanten Unterschied in der Dauer der Beatmung. Frühgeborene mit ROP wurden nahezu doppelt so lange beatmet (siehe Tabelle 5.5). Hierbei kann das Überangebot an Sauerstoff mitursächlich für die ROP sein [23].

Parenterale Ernährung und Steroide

Kinder mit höhergradiger ROP bzw. schwerer Bronchopulmonaler Dysplasie wurden länger parenteral ernährt und erhielten häufiger eine Glukokortikoid-Therapie (siehe Tabelle 5.6). Die erhobenen Ergebnisse bestätigen die aktuelle Literatur [19, 119].

Bluttransfusionen / Eisensupplementation

Schon vor über 30 Jahren erkannten Sacks *et al.*, dass das transfundierte Volumen von Erythrozytenkonzentraten mit einer höheren ROP-Inzidenz assoziiert ist [14]. Insbesondere ein kumulatives Bluttransfusionsvolumen von über 60 ml/kg Körpergewicht erhöht das Risiko signifikant. Dies bestätigt sich in der vorliegenden Fall-Kontroll-Studie. Frühgeborene mit höhergradiger ROP bekamen ein nahezu doppelt so großes Blutvolumen wie Frühgeborene ohne ROP transfundiert. Pathophysiologisch ist die kurzfristige bzw. rasche Erhöhung der Sauerstoffverfügbarkeit relevant. Dabei trägt die niedrigere Sauerstoffaffinität des transfundierten, adulten Hämoglobins A zu einer leichteren Sauerstoffabgabe in der Retina im Vergleich zum fetalen Hämoglobin F bei [120]. Je früher nach der Geburt eine Transfusions-therapie begonnen wurde, desto höher ist das Risiko für eine höhergradige ROP. Tatsächlich wurde in der Fall-Gruppe die Transfusionstherapie bereits am zweiten Lebenstag, in der Kontroll-Gruppe jedoch erst ab dem vierten Lebenstag begonnen. Weiterhin werden die retinalen Endothelzellen durch die Bildung von Sauerstoffradikalen geschädigt, deren Bildung durch freies Eisen begünstigt wird [121]. Sowohl wiederholte Bluttransfusionen als auch eine Eisensupplementierung erhöhen das Angebot an freiem Eisen. Dieser pathophysiologische Faktor konnte in der vorliegenden Studie nicht nachvollzogen werden. Kinder mit schwerer ROP bekamen signifikant weniger Eisen supplementiert (siehe Tabelle 5.7).

6.4 Zusammenfassung

Diese Fall-Kontroll-Studie zeigt, dass der *EPO*-Promotor-Polymorphismus rs1617640 nicht mit einem erhöhten Risiko für eine höhergradige ROP des Frühgeborenen assoziiert ist. Auch unter exogener rhEpo-Zufuhr ist der SNP nicht als zusätzlicher Risikofaktor für die schwere ROP identifizierbar. Bisher zeigte sich auch, dass eine hochdosierte rhEpo-Therapie zur Neuroprotektion nicht mit einem erhöhten ROP-Risiko assoziiert ist [110]. Ein primäres Konzept zur Prävention einer höhergradigen ROP muss die Reduktion von Bluttransfusionen, vermutlich auch durch Einsatz von rhEpo zur Prävention einer transfusionsbedürftigen Frühgeborenenanämie, berücksichtigen. Die optimale Therapie mit rhEpo, insbesondere mit subkutaner Verabreichung [122], sollte in randomisierten, klinischen Studien reevaluiert werden. Hierbei sollte vor allem die Neuroprotektion durch rhEpo berücksichtigt werden, da rhEpo unter anderem den Verlust (vor-)geschädigter Ganglienzellen der Retina reduzieren [116] und zu einer signifikanten Visusverbesserung bei indirekter, traumatischer Optikusneuropathie führen kann [123].

7. Literaturverzeichnis

- [1] EURO-PERISTAT Project. European Perinatal Health Report 2010. (Stand: 12.06.2016 auf http://www.europeristat.com/images/doc/EPHR2010_w_disclaimer.pdf).
- [2] AQUA-Institut für angewandte Qualitätsförderung und Forschung im Gesundheitswesen GmbH. NEO-Neonatologie Qualitätsindikatoren – Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2014. Göttingen, 2015.
- [3] Early Treatment for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. The incidence and course of retinopathy of prematurity: findings from the Early Treatment for Retinopathy of Prematurity Study. *Pediatrics* 2005;116:15-23.
- [4] Jousseaume A. Retinale Gefäßerkrankungen. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012. 462 S.
- [5] Terry TL. Extreme Prematurity and Fibroplastic Overgrowth of Persistent Vascular Sheath Behind Each Crystalline Lens. *Am J Ophthalmol* 1942;25:203-4.
- [6] Campbell K. Intensive oxygen therapy as a possible cause of retrolental fibroplasia; a clinical approach. *Med J Aust* 1951;2:48-50.
- [7] Kinsey VE, Arnold HJ, Hemphill F. Retrolental fibroplasia: cooperative study of retrolental fibroplasia and the use of oxygen. *Arch Ophthalmol* 1956;56:481-547.
- [8] Tin W, Milligan DW, Pennefather P, Hey E. Pulse oximetry, severe retinopathy, and outcome at one year babies of less than 28 weeks gestation. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2001;84:106-10.
- [9] Flynn JT. Acute proliferative retrolental fibroplasia: multivariate risk analysis. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1983;81:549-91.
- [10] Flynn JT, Bancalari E, Snyder ES, Goldberg RN, Feuer W, Cassady J, Schiffman J, Feldman HI, Baghynski B, Buckley E, Roberts J, Gillings D. A cohort study of transcutaneous oxygen tension and the incidence and severity of retinopathy of prematurity. *N Engl J Med* 1992;326:1050-4.
- [11] Penn JS, Tolman BL, Lowery LA. Variable oxygen exposure causes preretinal neovascularization in the newborn rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:576-85.
- [12] Seiberth V, Linderkamp O. Risk factors in retinopathy of prematurity. A multivariate statistical analysis. *Ophthalmologica* 2000;214:131-5.
- [13] Gilbert C, Fielder A, Gordillo L, Quinn G, Semiglia R, Visintin P, Zin A, International NO-ROP Group. Characteristics of infants with severe retinopathy of prematurity in countries with low, moderate and high levels of development: Implications for screening programs. *Pediatrics* 2005;115:518-25.

- [14] Sacks LM, Schaffer DB, Aday EK, Peckham GJ, Delivoria-Papadopoulos M. Retrolental fibroplasia and blood transfusion in very-low-birth-weight infants. *Pediatrics* 1981;68:770-4.
- [15] Inder TE, Clemett RS, Austin NC, Graham P, Darlow BA. High iron status in very low birth weight infants is associated with an increased risk of retinopathy of prematurity. *J Pediatr* 1997;131:541-4.
- [16] Aher SM, Ohlsson A. Early versus late erythropoietin for preventing red blood cell transfusion in preterm and/or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;10:CD004865.
- [17] Romagnoli C, Zecca E, Gallini F, Girlando P, Zuppa AA. Do recombinant human erythropoietin and iron supplementation increase the risk of retinopathy of prematurity? *Eur J Pediatr* 2000;159:627-34.
- [18] Garg R, Agthe AG, Donohue PK, Lehmann CU. Hyperglycemia and retinopathy of prematurity in very low birth weight infants. *J Perinatol* 2003;23:186-94.
- [19] Smolkin T, Steinberg M, Sujov P, Mezer E, Tamir A, Makhoul IR. Late postnatal systemic steroids predispose to retinopathy of prematurity in very-low-birth-weight infants: a comparative study. *Acta Paediatr* 2008;97:322-6.
- [20] Dammann O, Brinkhaus MJ, Bartels DB. Immaturity, perinatal inflammation, and retinopathy of prematurity: a multi-hit hypothesis. *Early Hum Dev* 2009;85:325-9.
- [21] Chen J, Smith LE. Retinopathy of prematurity. *Angiogenesis* 2007;10:133-40.
- [22] Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, D'Amato R, Sullivan R, D'Amore PA. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:101-11.
- [23] Hartnett ME, Penn JS. Mechanisms and management of retinopathy of prematurity. *N Engl J Med* 2012;367:2515-26.
- [24] Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1995;1:1024-8.
- [25] Ashton N. Oxygen and the growth and development of retinal vessels. In vivo and in vitro studies. *Am J Ophthalmol* 1966;62:412-35.
- [26] Smith LE, Shen W, Perruzzi C, Soker S, Kinose F, Xu X, Robinson G, Driver S, Bischoff J, Zhang B, Schaeffer JM, Senger DR. Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor. *Nat Med* 1999;5:1390-5.
- [27] Vogel ER, Britt RD Jr, Trinidad MC, Faksh A, Martin RJ, MacFarlane PM, Pabelick CM, Prakash YS. Perinatal oxygen in the developing lung. *Can J Physiol Pharmacol* 2015;93:119-27.

- [28] Hellström A, Ley D, Hansen-Pupp I, Hallberg B, Löfqvist C, van Marter L, van Weissenbruch M, Ramenghi LA, Beardsall K, Dunger D, Hård AL, Smith LE. Insulin-like growth factor 1 has multisystem effects on fetal and preterm infant development. *Acta Paediatr* 2016; doi:10.1111/apa.13350.
- [29] Mintz-Hittner HA, Kennedy KA, Chuang AZ, BEAT-ROP Cooperative Group. Efficacy of intravitreal bevacizumab for stage 3+ retinopathy of prematurity. *N Engl J Med* 2011;364:603-15.
- [30] Leitlinien der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrischen Intensivmedizin. Augenärztliche Screening-Untersuchungen von Frühgeborenen. (Stand 01.05.2016 auf <http://awmf.org/leitlinien/detail/II/024-010.html>).
- [31] The Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity. The international classification of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 1984;102:1130-4.
- [32] The international Committee for the Classification of the Late Stages of Retinopathy of Prematurity. An international classification of retinopathy of prematurity. II. The classification of retinal detachment. *Arch Ophthalmol* 1987;105:906-12.
- [33] Sasidharan CK, Kumar MS, Anoop P, Syamala B, Das BN. Spontaneous regression of retinopathy of prematurity. *Indian J Pediatr* 2003;70:359-60.
- [34] Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. Multicenter trial of cryotherapy for retinopathy of prematurity. Preliminary results. *Arch Ophthalmol* 1988;106:471-9.
- [35] Nicoară SD, Nascutzy C, Cristian C, Irimescu I, Ștefănuț AC, Zaharie G, Drugan T. Outcomes and Prognostic Factors of Intravitreal Bevacizumab Monotherapy in Zone I Stage 3+ and Aggressive Posterior Retinopathy of Prematurity. *J Ophthalmol* 2015;2015:102582.
- [36] Bizzarro MJ, Hussain N, Jonsson B, Feng R, Ment LR, Gruen JR, Zhang H, Bhandari V. Genetic susceptibility to retinopathy of prematurity. *Pediatrics* 2006;118:1858-63.
- [37] Darlow BA, Hutchinson JL, Henderson-Smart DJ, Donoghue DA, Simpson JM, Evans NJ, Australian and New Zealand Neonatal Network. Prenatal risk factors for severe retinopathy of prematurity among very preterm infants of the Australian and New Zealand Neonatal Network. *Pediatrics* 2005;115:990-6.
- [38] Yang MB, Donovan EF, Wagge JR. Race, gender, and clinical risk index for babies (CRIB) score as predictors of severe retinopathy of prematurity. *J AAPOS* 2006;10:253-61.
- [39] Saunders RA, Donahue ML, Christmann LM, Pakalnis AV, Tung B, Hardy RJ, Phelps DL. Racial variation in retinopathy of prematurity. The Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. *Arch Ophthalmol* 1997;115:604-8.

- [40] Knippers R. Biologische Gen-Karten bei Menschen. In: Knippers R. Molekulare Genetik. 9th ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2006:502-14.
- [41] Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene* 1999;234:177-86.
- [42] Halushka MK, Fan JB, Bentley K, Hsie L, Shen N, Weder A, Cooper R, Lipshutz R, Chakravarti A. Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nat Genet* 1999;22:239-47.
- [43] Shastri BS. SNPs in disease gene mapping, medicinal drug development and evolution. *J Hum Genet* 2007;52:871-80.
- [44] Lohrer HD, Tangen U. Investigations into the molecular effects of single nucleotide polymorphism. *Pathobiology* 2000;68:283-90.
- [45] Tong Z, Yang Z, Patel S, Chen H, Gibbs D, Yang X, Hau VS, Kaminoh Y, Harmon J, Pearson E, Buehler J, Chen Y, Yu B, Tinkham NH, Zabriskie NA, Zeng J, Luo L, Sun JK, Prakash M, Hamam RN, Tonna S, Constantine R, Ronquillo CC, Satta S, Avery RL, Brand JM, London N, Anduze AL, King GL, Bernstein PS, Watkins S; Genetics of Diabetes and Diabetic Complication Study Group, Jorde LB, Li DY, Aiello LP, Pollak MR, Zhang K. Promoter polymorphism of the erythropoietin gene in severe diabetic eye and kidney complications. *PNAS* 2008;105:6998-7003.
- [46] Härtel C, König I, Köster S, Kattner E, Kuhls E, Küster H, Möller J, Müller D, Kribs A, Segerer H, Wieg C, Herting E, Göpel W. Genetic polymorphisms of hemostasis genes and primary outcome of very low birth weight infants. *Pediatrics* 2006;118:683-9.
- [47] Ray D, Mishra M, Ralph S, Read I, Davies R, Brenchley P. Association of the VEGF gene with proliferative diabetic retinopathy but not proteinuria in diabetes. *Diabetes* 2004;53:861-4.
- [48] Stevens A, Soden J, Brenchley PE, Ralph S, Ray DW. Haplotype analysis of the polymorphic human vascular endothelial growth factor gene promoter. *Cancer Res* 2003;63:812-6.
- [49] Vannay A, Dunai G, Bányász I, Szabó M, Vámos R, Treszl A, Hajdú J, Tulassay T, Vásárhelyi B. Association of genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor and risk for proliferative retinopathy of prematurity. *Pediatr Res* 2005;57:396-8.
- [50] Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine* 2000;12:1232-5.
- [51] Cooke RW, Drury JA, Mountford R, Clark D. Genetic polymorphisms and retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1712-5.
- [52] Liu P, Wu D, Zhou W, Li Y, Lian C, Yang Y, Feng Z. Association of VEGF gene polymorphisms with advanced retinopathy of prematurity: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2012;39:10731-7.

- [53] Balogh A, Derzbach L, Vannay A, Vászrhelyi B. Lack of association between insulin-like growth factor I receptor G(+3174)A polymorphism and retinopathy of prematurity. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006;244:1035-8.
- [54] Bonafè M, Barbieri M, Marchegiani F, Olivieri F, Ragno E, Giampieri C, Mugianesi E, Centurelli M, Franceschi C, Paolisso G. Polymorphic variants of insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor and phosphoinositide 3-kinase genes affect IGF-I plasma levels and human longevity. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3299-304.
- [55] Li R, Lyn D, Lapu-Bula R, Oduwole A, Igho-Pemu P, Lankford B, Morgan J, Nkemdechi S, Liu G, Pack C, Silvestrov N, von Deutsch DA, Song Q, Abukhalaf IK, Ofili E. Relation of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide level, endothelial function, and blood pressure in African Americans. *Am J Hypertens* 2004;17:560-7.
- [56] Rusai K, Vannay A, Szebeni B. Endothelial nitric oxide synthase gene T-786C and 27-bp repeat gene polymorphisms in retinopathy of prematurity. *Mol Vis* 2008;14:286-90.
- [57] Brooks SE, Gu X, Samuel S, Marcus DM, Bartoli M, Huang PL, Caldwell RB. Reduced severity of oxygen-induced retinopathy in eNOS-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:222-8.
- [58] Haider MZ, Devarajan LV, Al-Essa M, Kumar H. A C597-->A polymorphism in the Norrie disease gene is associated with advanced retinopathy of prematurity in premature Kuwaiti infants. *J Biomed Sci* 2002;9:365-70.
- [59] Stockman JA 3rd, Graeber JE, Clark DA, McClellan K, Garcia JF, Kavey RE. Anemia of prematurity: determinants of the erythropoietin response. *J Pediatr* 1984;105:786-92.
- [60] U.S. Food and Drug Administration. Information for Healthcare Professionals: Erythropoiesis Stimulating Agents (ESA) [Aranesp (darbepoetin), Epogen (epoetin alfa), and Procrit (epoetin alfa)] 2007. (Stand: 25.05.2016 auf <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm126481.htm>)
- [61] Paul-Ehrlich-Institut und Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte. Erythropoietin – zusätzliches Risiko einer Retinopathie bei Frühgeborenen nicht auszuschließen. *Bulletin zur Arzneimittelsicherheit* 2015;3:3-6.
- [62] Aher SM, Ohlsson A. Early versus late erythropoietin for preventing red blood cell transfusion in preterm and/or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;CD004865.
- [63] Wenger RH, Kurtz A. Erythropoietin. *Compr Physiol* 2011;1:1759-94.
- [64] Sawada K, Krantz SB, Dai CH, Koury ST, Horn ST, Glick AD, Civin CI. Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors. *J Cell Physiol* 1990;142:219-30.

- [65] Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O, Ihle JN. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 1993;74:227-36.
- [66] Kelley LL, Green WF, Hicks GG, Bondurant MC, Koury MJ, Ruley HE. Apoptosis in erythroid progenitors deprived of erythropoietin occurs during the G1 and S phases of the cell cycle without growth arrest or stabilization of wild-type p53. *Mol Cell Biol* 1994;14:4183-92.
- [67] Carlini RG, Reyes AA, Rothstein M. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis in vitro. *Kidney Int* 1995;47:740-5.
- [68] Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, Boehm SM, Menne J, Haller H, Fliser D. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood* 2004;103:921-6.
- [69] Chen J, Connor KM, Aderman CM, Smith LE. Erythropoietin deficiency decreases vascular stability in mice. *J Clin Invest* 2008;118:526-33.
- [70] Li Y, Lu Z, Keogh CL, Yu SP, Wei L. Erythropoietin-induced neurovascular protection, angiogenesis, and cerebral blood flow restoration after focal ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007;27:1043-54.
- [71] Watanabe D, Suzuma K, Matsui S, Kurimoto M, Kiryu J, Kita M, Suzuma I, Ohashi H, Ojima T, Murakami T, Kobayashi T, Masuda S, Nagao M, Yoshimura N, Takagi H. Erythropoietin as a Retinal Angiogenic Factor in Proliferative Diabetic Retinopathy. *N Engl J Med* 2005;353:782-92.
- [72] Junk AK, Mammis A, Savitz SI, Singh M, Roth S, Malhotra S, Rosenbaum PS, Cerami A, Brines M, Rosenbaum DM. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:10659-64.
- [73] Sato T, Kusaka S, Shimojo H, Fujikado T. Vitreous levels of erythropoietin and vascular endothelial growth factor in eyes with retinopathy of prematurity. *Ophthalmology* 2009;116:1599-603.
- [74] Xiong SQ, Xia XB, Xu HZ, Jiang J. Suppression of Retinal Neovascularization by Small-Interference RNA Targeting Erythropoietin. *Ophthalmologica* 2009;223:306-12.
- [75] Watkins PC, Eddy R, Hoffman N, Stanislovitis P, Beck AK, Galli J, Vellucci V, Gusella JF, Shows TB. Regional assignment of the erythropoietin gene to human chromosome region 7pter----q22. *Cytogenet Cell Genet* 1986;42:214-8.
- [76] Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, Seehra J, Jones SS, Hewick R, Fritsch EF. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 1985;313:806-10.

- [77] Dame C, Sola MC, Lim KC, Leach KM, Fandrey J, Ma Y, Knöpfle G, Engel JD, Bungert J. Hepatic erythropoietin gene regulation by GATA-4. *J Biol Chem* 2004;279:2955-61.
- [78] Dame C, Kirschner KM, Bartz KV, Wallach T, Hussels CS, Scholz H. Wilms tumor suppressor, Wt1, is a transcriptional activator of the erythropoietin gene. *Blood* 2006;107:4282-90.
- [79] Gupta M, Mungai PT, Goldwasser E. A new transacting factor that modulates hypoxia-induced expression of the erythropoietin gene. *Blood* 2000;96:491-7.
- [80] Sánchez-Elsner T, Ramírez JR, Sanz-Rodríguez F, Varela E, Bernabéu C, Botella LM. A cross-talk between hypoxia and TGF-beta orchestrates erythropoietin gene regulation through SP1 and Smads. *J Mol Biol* 2004;336:9-24.
- [81] Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992;12:5447-54.
- [82] Pugh CW, Ebert BL, Ebrahim O, Ratcliffe PJ. Characterisation of functional domains within the mouse erythropoietin 3' enhancer conveying oxygen-regulated responses in different cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1994;1217:297-306.
- [83] Blanchard KL, Acquaviva AM, Galson DL, Bunn HF. Hypoxic induction of the human erythropoietin gene: cooperation between the promoter and enhancer, each of which contains steroid receptor response elements. *Mol Cell Biol* 1992;12:5373-85.
- [84] Ebert BL, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene. *Blood* 1999;94:1864-77.
- [85] Semenza L, Dureza RC, Traystman MD, Gearhart JD, Antonarakis SE. Human erythropoietin gene expression in transgenic mice: multiple transcription initiation sites and cis-acting regulatory elements. *Mol Cell Biol* 1990;10:930-8.
- [86] Lee-Huang S, Lin JJ, Kung HF, Huang PL, Lee L, Huang PL. The human erythropoietin-encoding gene contains a CAAT box, TATA boxes and other transcriptional regulatory elements in its 5' flanking region. *Gene* 1993;128:227-36.
- [87] Storti F, Santambrogio S, Crowther LM, Otto T, Abreu-Rodríguez I, Kaufmann M, Hu CJ, Dame C, Fandrey J, Wenger RH, Hoogewijs D. A novel distal upstream hypoxia response element regulating oxygen-dependent erythropoietin gene expression. *Haematologica* 2014;99:e45-e48.
- [88] Ghezzi S, Del Bo R, Scarlato M, Nardini M, Carlesi C, Prella A, Corti S, Mancuso M, Briani C, Siciliano G, Murri L, Bresolin N, Comi GP. Is erythropoietin gene a modifier factor in amyotrophic lateral sclerosis? *Neurobiol Aging* 2009;30:842-4.
- [89] Percy MJ, McMullin MF, Lappin TR. Sequence analysis of the 3' hypoxia-responsive element of the human erythropoietin gene in patients with erythrocytosis. *Biochem Mol Med* 1997;62:132-4.

- [90] Deindl P, Klar M, Drews D, Cremer M, Gammella E, Gassmann M, Dame C. Mice over-expressing human erythropoietin indicate that erythropoietin enhances expression of its receptor via up-regulated Gata1 and Tal1. *Haematologica* 2014;99:e205-7.
- [91] Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995;270:1230-7.
- [92] Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999;399:271-5.
- [93] Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001;292:468-72.
- [94] Bunn HF, Gu J, Huang LE, Park JW, Zhu H. Erythropoietin: a model system for studying oxygen-dependent gene regulation. *J Exp Biol* 1998;201:1197-201.
- [95] Sears JE, Hoppe G, Ebrahim Q, Anand-Apte B. Prolyl hydroxylase inhibition during hyperoxia prevents oxygen-induced retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:19898-903.
- [96] van Wijngaarden P, Brereton HM, Coster DJ, Williams KA. Genetic influences on susceptibility to oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:1761-6.
- [97] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5463-7.
- [98] Abhary S, Burdon KP, Casson RJ, Goggin M, Petrovsky NP, Craig JE. Association between erythropoietin gene polymorphisms and diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 2010;128:102-6.
- [99] Song Q, Zhang Y, Wu Y, Zhou F, Qu Y. Association of erythropoietin gene polymorphisms with retinopathy in a Chinese cohort with type 2 diabetes mellitus. *Clin Experiment Ophthalmol* 2015;43:544-9.
- [100] Balasubbu S, Sundaresan P, Rajendran A, Ramasamy K, Govindarajan G, Perumalsamy N, Hejtmancik JF. Association analysis of nine candidate gene polymorphisms in Indian patients with type 2 diabetic retinopathy. *BMC Medical Genetics* 2010;11:158.
- [101] Iyengar SK, Abboud HE, Goddard KAB, Saad MF, Adler SG, Arar NH, Bowden DW, Duggirala R, Elston RC, Hanson RL, Ipp E, Kao WH, Kimmel PL, Klag MJ, Knowler WC, Meoni LA, Nelson RG, Nicholas SB, Pahl MV, Parekh RS, Quade SR, Rich SS, Rotter JI, Scavini M, Schelling JR, Sedor JR, Sehgal AR, Shah VO, Smith MW, Taylor KD, Winkler CA, Zager PG, Freedman BI; Family Investigation of Nephropathy and Diabetes Research Group. Genome-Wide Scans for Diabetic

Nephropathy and Albuminuria in Multiethnic Populations: The Family Investigation of Nephropathy and Diabetes (FIND). *Diabetes* 2007;56:1577-85.

- [102] Shastry BS. SNP alleles in human disease and evolution. *J Hum Genet.* 2002;47:561-6.
- [103] Lazarus R, Vercelli D, Palmer LJ, Klimecki WJ, Silverman EK, Richter B, Riva A, Ramoni M, Martinez FD, Weiss ST, Kwiatkowski DJ. Single nucleotide polymorphisms in innate immunity genes: abundant variation and potential role in complex human disease. *Immunol Rev* 2002;190:9-25.
- [104] Popov AF, Schulz EG, Schmitto JD, Coskun KO, Tzvetkov MV, Kazmaier S, Zimmermann J, Schöndube FA, Quintel M, Hinz J. Relation between renal dysfunction requiring renal replacement therapy and promoter polymorphism of the erythropoietin gene in cardiac surgery. *Artif Organs* 2010;34:961-8.
- [105] Corwin HL, Gettinger A, Fabian TC, May A, Pearl RG, Heard S, An R, Bowers PJ, Burton P, Klausner MA, Corwin MJ, EPO Critical Care Trials Group. Efficacy and Safety of Epoetin Alfa in Critically Ill Patients. *N Engl J Med* 2007; 357:965-76.
- [106] Ma W, Kantarjian H, Zhang K, Zhang X, Wang X, Chen C, Donahue AC, Zhang Z, Yeh CH, O'Brien S, Garcia-Manero G, Caporaso N, Landgren O, Albitar M. Significant association between polymorphism of the erythropoietin gene promoter and myelodysplastic syndrome. *BMC Med Genet* 2010;11:163.
- [107] Khabour OF, Bani-Ahmad MA, Hammash NM. Association between polymorphisms in erythropoietin gene and upper limit haematocrit levels among regular blood donors. *Transfusion Clinique et Biologique* 2012;19:353-7.
- [108] Kästner A, Grube S, El-Kordi A, Stepniak B, Friedrichs H, Sargin D, Schwitulla J, Begemann M, Giegling I, Miskowiak KW, Sperling S, Hannke K, Ramin A, Heinrich R, Gefeller O, Nave KA, Rujescu D, Ehrenreich H. Common variants of the genes encoding Erythropoietin and its receptor modulate cognitive performance in Schizophrenia. *Mol Med* 2012;18:1029-40.
- [109] Leuchter RH, Gui L, Poncet A, Hagmann C, Lodygensky GA, Martin E, Koller B, Darqué A, Bucher HU, Hüppi PS. Association between early administration of high-dose erythropoietin in preterm infants and brain MRI abnormality at term-equivalent age. *JAMA* 2014;312:817-24
- [110] Fauchere JC, Koller BM, Tschopp A, Dame C, Ruegger C, Bucher HU. Safety of Early High-Dose Recombinant Erythropoietin for Neuroprotection in Very Preterm Infants. *J Pediatr* 2015;167:52-7.
- [111] Natalucci G, Latal B, Koller B, Rüeeggler C, Sick B, Held L, Bucher HU, Fauchère JC, Swiss EPO Neuroprotection Trial Group. Effect of Early Prophylactic High-Dose Recombinant Human Erythropoietin in Very Preterm Infants on Neurodevelopmental Outcome at 2 Years: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2016;315:2079-85.

- [112] Song J, Sun H, Xu F, Kang W, Gao L, Guo J, Zhang Y, Xia L, Wang X, Zhu C. Recombinant human erythropoietin improves neurological outcomes in very preterm infants. *Ann Neurol* 2016;doi:10.1002/ana.24677.
- [113] Juul SE, McPherson RJ, Bauer LA, Ledbetter KJ, Gleason CA, Mayock DE. A phase I/II trial of high-dose erythropoietin in extremely low birth weight infants: pharmacokinetics and safety. *Pediatrics* 2008;122:383-91.
- [114] Fauchère JC, Dame C, Vonthein R, Koller B, Arri S, Wolf M, Bucher HU. An approach to using recombinant erythropoietin for neuroprotection in very preterm infants. *Pediatrics* 2008;122:375-82.
- [115] Ohlsson A, Aher SM. Early erythropoietin for preventing red blood cell transfusion in preterm and/or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;4:CD004863.
- [116] Yamasaki M, Mishima HK, Yamashita H, Kashiwagi K, Murata K, Minamoto A, Inaba T. Neuroprotective effects of erythropoietin on glutamate and nitric oxide toxicity in primary cultured retinal ganglion cells. *Brain Res* 2005;1050:15-26.
- [117] Roth DB, Morales D, Feuer WJ, Hess D, Johnson RA, Flynn JT. Screening for retinopathy of prematurity employing the retcam 120: sensitivity and specificity. *Arch Ophthalmol* 2001;119:268-72.
- [118] Kumar P, Sankar MJ, Deorari A, Azad R, Chandra P, Agarwal R, Paul V. Risk factors for severe retinopathy of prematurity in preterm low birth weight neonates. *Indian J Pediatr* 2011;78:812-6.
- [119] Brown MS, Barón AE, France EK, Hamman RF. Association between higher cumulative doses of recombinant erythropoietin and risk for retinopathy of prematurity. *J AAPOS* 2006;10:143-9.
- [120] Cooke RWI, Clark D, Hickey-Dwyer M, Weindling AM. The apparent role of blood transfusions in the development of retinopathy of prematurity. *J Pediatr* 1993;152:833-6.
- [121] Sullivan JL. Retinopathy of Prematurity and Iron: A Modification of the Oxygen Hypothesis. *Pediatrics* 1986;78:1171-2.
- [122] Dame C, Langer J, Koller BM, Fauchère JC, Bucher HU. Urinary erythropoietin concentrations after early short-term infusion of high-dose recombinant epo for neuroprotection in preterm neonates. *Neonatology* 2012;102:172-7.
- [123] Kashkouli MB, Pakdel F, Sanjari MS, Haghighi A, Nojomi M, Homae MH, Heirati A. Erythropoietin: a novel treatment for traumatic optic neuropathy-a pilot study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011;249:731-6.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Carolin Rau, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Relevanz des Polymorphismus rs1617640 im Promotor des *Erythropoietin*-Gens bei Frühgeborenen mit schwerer Retinopathie“

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Berlin, den 15.06.2016

Carolin Rau

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Veröffentlichungen

Dame C, Rau C, Sciesielski LK, Thorwardt A, Klar M, Bühler C. The Epo promotor polymorphism rs1617640 is no risk factor for ROP in VLBW infants. Manuskript in Vorbereitung.

Die Arbeit wurde im Rahmen des internationalen Klaus-Betke Symposiums in München am 1. und 2. März 2013 als Poster vorgestellt: „**Dame C, Rau C, Bühler C, Klar C.** Controversies on the implication of *erythropoietin* (Epo) gene polymorphisms in humans“.

Danksagung

Mein Dank geht an erster Stelle an Herrn Prof. Dr. med. Christof Dame für die Überlassung des spannenden Themas und die engagierte Betreuung der Arbeit. Sein mir entgegengebrachtes Vertrauen ermöglichte mir, interessante Erfahrungen mit wissenschaftlichen und experimentellen Arbeiten zu sammeln.

Weiterhin bedanke ich mich bei dem Team der AG Molekulare Neonatologie für die herzliche Aufnahme im Labor. Besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Victoria Hoene für ihre fachliche und überaus freundschaftliche Unterstützung im Laboralltag sowie Dr. med. Anne Thorwardt für ihre technische Einweisung im Labor. Ebenfalls weiß ich die Arbeit von Barbara Mitko sehr zu schätzen. Ich möchte mich auch bei Boris Metze für seine Hilfe bei mathematisch-statistischen Berechnungen und Dr. med. Bernd Pilgermann für die Funktion als Datentreuhänder sowie Bernd Berger für die Unterstützung aus dem Screeninglabor bedanken. Ein ganz großes Dankeschön gilt Dr. rer. medic. Lina Sciesielski für ihre tatkräftige Unterstützung, diese Promotionsarbeit zu vollenden.

Ebenso bin ich für den Rückhalt meiner Familie und Freunde sehr dankbar. Insbesondere danke ich meinen Eltern Anne-Katrin Persdorf und Olaf Rau für ihre Liebe, den mir entgegengebrachten Stolz und die jahrelange Unterstützung. Außerdem danke ich meinem Lebensgefährten Michael Helbig, der bedingungslos hinter mir steht.

Mein größter Dank gebührt meiner kleinen Schwester Antonia, die mir weit mehr als nur eine Schwester ist.