

Aus dem Perinatalzentrum - Neonatologie der Kinderklinik  
der Klinik und Poliklinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Campus Innenstadt

Klinik der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. Christoph Klein

**Charakterisierung des Proteoms Frühgeborener  
anhand von Trockenblutproben  
mit Fokus auf die postnatale und gestationsalterabhängige  
Entwicklung des Proteoms**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrads der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-  
Maximilians- Universität, München

Vorgelegt von

Robin Tamara Eisenburger

Aus Augsburg

2023

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Orsolya Genzel-Boroviczény

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Axel Imhof  
Prof. Dr. Frederick Klauschen  
Prof. Dr. Matthias Mann

Mitbetreuung durch den Dr. Susanne Pangratz- Fuehrer  
promovierten Mitarbeiter: Dr. Philipp Geyer, Dr. Johannes Müller-Reif

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 02.02.2023

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Frühgeburtlichkeit.....	1
1.2	Outcome von Frühgeborenen.....	2
1.3	Organogenese.....	3
1.3.1	Entwicklung des Gehirns.....	4
1.3.2	Entwicklung der Lunge.....	5
1.3.3	Entwicklung der Niere.....	6
1.3.4	Entwicklung des Herzens.....	7
1.4	Blutgerinnung.....	8
1.5	Immunsystems.....	8
1.6	Das Proteom.....	11
1.7	Biomarker.....	13
1.8	Massenspektrometrie.....	13
1.9	Aktueller Stand der Forschung.....	18
1.10	Ziel der Studie.....	20
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Patientenkollektiv.....	21
2.2	Einverständniserklärung.....	21
2.3	Studiendesign.....	22
2.3.1	Zeitpunkt der Probenentnahme.....	22
2.3.2	Klinische Daten des Neugeborenen und der Mutter.....	22
2.3.3	Fragebogen.....	23
2.4	Datenschutz.....	23
2.5	Untersuchung des Proteoms.....	23
2.5.1	Probengewinnung und Lagerung.....	23
2.5.2	Probenprozessierung und massenspektrometrische Auswertung.....	24
2.5.3	Qualitätskontrolle.....	25
2.5.4	Work-Flow-Validation.....	25

2.6	Datenauswertung.....	26
2.6.1	Statistische Analyse der klinischen Daten .....	26
2.6.2	Analyse der massenspektrometrischen Rohdaten.....	26
2.6.3	Bioinformatische Analyse der Proteom-Daten .....	26
3	Ergebnisse.....	28
3.1	Kohortenübersicht.....	28
3.2	Klinische Daten .....	30
3.2.1	Basisdaten der Kinder.....	30
3.2.2	Basisdaten der Eltern .....	32
3.2.3	Schwangerschaft .....	34
3.3	Proteom-Daten.....	35
3.3.1	Übersicht der gewonnenen Blutproben.....	35
3.3.2	Statistische Vorgehensweise in der Analyse der Entwicklung Frühgeborener .....	36
3.3.3	Basisdaten der Massenspektrometrischen Auswertung.....	37
3.3.4	Querschnittsdaten: Vergleich des Proteoms von Früh- und Reifgeborenen .....	39
3.3.4.1	Vergleich von Früh- und Reifgeborenen zum Zeitpunkt G (Intrauterine Entwicklung)	39
3.3.4.2	Vergleich von Früh- und Reifgeborenen zum Zeitpunkt NGS, NGS32+0 und E.....	44
3.3.5	Longitudinale Daten: Postnatale Entwicklung des Proteoms Frühgeborener .....	44
3.3.6	Vergleich der Querschnitts- und longitudinalen Daten (Gestationsalter vs. postnatal)	50
3.3.7	Vergleich des Proteoms von Frühgeborenen mit gleichem (korrigierten) Gestationsalter	52
3.3.8	Proteine im Zusammenhang mit der Organogenese .....	53
4	Diskussion.....	56
4.1	Zusammenfassung.....	56
4.2	Diskussion der Ergebnisse .....	57
4.2.1	Alpha-Fetoprotein (AFP).....	58
4.2.2	Erythrozytäre Proteine und Hämoglobin .....	58
4.2.3	Apolipoproteine.....	61

4.2.4	Blutgerinnung .....	63
4.2.5	Immunsystem .....	66
4.2.6	Organogenese .....	71
4.3	Diskussion der Methodik.....	75
4.3.1	Massenspektrometrie .....	75
4.3.2	Studiendesign .....	76
4.3.3	Ethische Fragestellungen.....	78
5	Zusammenfassung .....	79
6	Schlussfolgerung und Ausblick .....	81
7	Literaturverzeichnis .....	83
8	Anhang.....	101
8.1	Zusätzliche Tabellen und Abbildungen.....	101
8.1.1	Kohortenübersicht.....	101
8.1.2	Klinische Daten .....	101
8.1.2.1	Basisdaten der Neugeborenen .....	101
8.1.2.2	Basisdaten der Eltern.....	103
8.1.2.3	Schwangerschaft .....	104
8.1.3	Proteom Daten .....	104
8.1.3.1	Übersicht über gewonnene Blutproben.....	104
8.1.3.2	Basisdaten der massenspektrometrischen Auswertung .....	105
8.2	Einwilligungserklärung .....	106
8.3	Fragebogen.....	111
9	Danksagung .....	114
10	Affidavit .....	115
11	Curriculum Vitae .....	116
12	Publikationsliste.....	117

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Proteomik-Arbeitsfluss .....	15
Abbildung 2: Aufbau eines Massenspektrometers .....	17
Abbildung 3: Blutabnahmeschema für Frühgeborene .....	22
Abbildung 4: Pseudonymisierung der Blutproben .....	23
Abbildung 5: Flowchart-Patientenrekrutierung .....	29
Abbildung 6: Zeitliche Übersicht der Blutprobenentnahme .....	36
Abbildung 7: Analyseschema der Entwicklung des Blutproteoms von Frühgeborenen .....	37
Abbildung 8: Vergleich von Früh- und Reifgeborenen .....	38
Abbildung 9: Querschnitt- Vergleich der Frühgeborenen-Gruppen mit Reifgeborenen zum Zeitpunkt Geburt .....	40
Abbildung 10: Gestationsalterabhängiger Verlauf der signifikanten Proteine aus Vergleich der Früh- und Reifgeborenen zum Zeitpunkt G .....	42
Abbildung 11: Cluster aus Vergleich der Früh- und Reifgeborenen.....	43
Abbildung 12: Longitudinal- Postnatale Dynamik des Proteinprofils Frühgeborener .....	45
Abbildung 13: Verlauf der Proteine mit signifikanter postnataler Dynamik.....	47
Abbildung 14: Postnataler Verlauf des Proteomprofils der Frühgeborenen-Gruppen.....	49
Abbildung 15: Vergleich der gestationsalterabhängigen und postnatalen Proteindynamik .....	51
Abbildung 16: Dynamik der Proteine (N=15) aus Cluster 3.....	51
Abbildung 17: Vergleich von Frühgeborenen bei Geburt mit GA <32 SSW und bei kGA von 32 SSW ..	52
Abbildung 18: Proteine in Zusammenhang mit der Organogenese .....	54

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Anthropometrische Daten der Neugeborenen .....	30
Tabelle 2: Erkrankungen der Neugeborenen .....	31
Tabelle 3: Basisdaten der Eltern.....	33
Tabelle 4: Schwangerschaft.....	34
Tabelle 5: Übersicht der abgenommenen Filterkarten .....	35
Tabelle 6: Longitudinale Abnahme.....	35
Tabelle 7: Missing Data der Entnahmezeitpunkte .....	36
Tabelle 8: Anzahl der signifikanten Proteine bei Vergleich von Früh- und Reifgeborenen zum Zeitpunkt G, NGS, NGS 32+0 und E.....	44
Tabelle 9: Anzahl der signifikanten Proteine beim Vergleich der Abnahmezeitpunkte .....	48

## Abkürzungsverzeichnis

### **A**

AFP ..... *Alpha-Fetoprotein*

ASD ..... *Atriumseptumdefekt*

### **B**

BPD ..... *Bronchopulmonale Dysplasie*

### **C**

CA1 ..... *Carboanhydrase 1*

CA2 ..... *Carboanhydrase 2*

### **E**

E ..... *Entlassung*

### **G**

G ..... *Geburt*

### **H**

HIE ..... *Hypoxisch-ischämische Encephalopathie*

### **I**

ICH ..... *Intrazerebrale Blutung*

IVH ..... *Intraventrikuläre Hämorrhagie*

### **K**

kGA ..... *korrigiertes Gestationsalter*

### **M**

MS ..... *Massenspektrometrie*

### **N**

NEC ..... *Nekrotisierende Enterokolitis*

NGS ..... *Neugeborenencreening*

NGS 32+0 ..... *Neugeborenencreening bei einem korrigierten Gestationsalter von 32 Schwangerschaftswochen*

### **P**

PDA ..... *Persistierender Ductus arteriosus*

PVE ..... *Periventrikuläre Echogenitätserhöhung*

PVL ..... *Periventrikuläre Leukomalazie*

### **R**

RDS ..... *Respiratory Distress Syndrom*

RG ..... *Reifgeborene*

ROP ..... *Retinopathia praematurorum*

### **V**

VSD ..... *Ventrikelseptumdefekt*

## 1 Einleitung

Es konnten bereits große Fortschritte in der intensivmedizinischen Versorgung von Frühgeborenen erreicht werden. Nichtsdestotrotz ist Frühgeburtlichkeit immer noch mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko assoziiert. Frühgeborene leiden sowohl in der Neonatalperiode als auch im Jugend- und Erwachsenenalter öfters an schwerwiegenden Erkrankungen, die auf die Unreife des Organismus zurückgeführt werden. Die zentrale Rolle des Blutes in der menschlichen Physiologie im Sinne einer Kommunikation mit allen Organen impliziert, dass Blut den biologischen Zustand bzw. Phänotypen des Einzelnen auf Proteinebene widerspiegelt. Folglich eignet sich Blut hervorragend für eine systemische Analyse der Entwicklung Reif- bzw. Frühgeborener. Aufgrund der nur geringen Menge an Blut, die abgenommen werden kann, gestaltet sich dies jedoch technisch schwierig. Alle Proteine eines biologischen Systems, hier des Blutes, werden unter dem Begriff Proteom zusammengefasst. Massenspektrometrie ermöglicht die Analyse des Blutproteoms anhand kleinster Blutmengen in einem unvoreingenommenen, hypothesenfreien Ansatz. Mit der Implementierung von Trockenblutproben auf Filterkarten konnte zusätzlich eine leicht zu handhabende, minimal invasive Methode etabliert werden, die es ermöglicht, Proteinmuster und potenzielle Biomarker für die durchlaufenen Entwicklungsstufen des frühgeborenen Kindes zu finden.

### 1.1 Frühgeburtlichkeit

Jährlich werden ca. 15 Millionen Neugeborene zu früh geboren. Im Jahr 2014 betrug der Anteil aller Frühgeburten ca. 10,6%, Tendenz steigend (1). Frühgeburtlichkeit wird als Geburt vor Abschluss der 37. Schwangerschaftswoche (SSW) post menstruationem definiert (2). Sie geht mit einer erhöhten Morbidität einher und ist mit 35% aller Todesfälle unter Neugeborenen (<28 Tage) und 18% aller Kinder unter 5 Jahren weltweit die führende Todesursache in der pädiatrischen Bevölkerung (1). Insgesamt beeinflusst Frühgeburtlichkeit mit den einhergehenden gesundheitlichen Konsequenzen und Komplikationen sogar ca. 50% aller Todesfälle im Neugeborenenalter (3). Besonders in Entwicklungsländern, vor allem in Südost-Asien und dem Subsahara-Afrika (80% aller Frühgeburten weltweit), ist der Anteil mit 12% besonders hoch (1). In Deutschland liegt er im Vergleich bei 9,2% (4). Allerdings ist die Frühgeburtlichkeitsrate insgesamt geographisch und regional auch innerhalb ähnlich einkommensstarker Länder sehr variabel (5). Unterschiede konnten ebenfalls in Abhängigkeit der Bildung der Mutter und der Ethnizität gefunden werden (6, 7).

Die WHO teilt Frühgeborene (FG) in 3 Untergruppen in Abhängigkeit des Gestationsalters (GA) bei Geburt ein: Geburt vor Abschluss der 28. SSW (extrem frühe Frühgeborene, „ExtFG“), Geburt zwischen 28+0 und 31+6 SSW (sehr frühe Frühgeborene, „SehrFG“) und Geburt zwischen 32+0 und 36+6 SSW (moderat bis späte Frühgeborene, „SpätFG“)(8). Der Großteil der FG fällt mit 85% in die Gruppe der

SpätFG. Nur 5% werden vor Abschluss der 28. SSW und 10% zwischen 28 und 32 SSW geboren (2, 4). Die Bestimmung des GA erfolgt i.d.R. anhand der letzten Menstruationsblutung der Mutter oder anhand des Ersttrimester-Ultraschalls.

Das korrigierte Gestationsalter (kGA) wird nach der Geburt herangezogen und beschreibt das GA des Neugeborenen bei angenommenem physiologischem Schwangerschaftsverlauf. Es berechnet sich aus GA plus postnatalem Alter.

## **1.2 Outcome von Frühgeborenen**

Neben der Mortalität steigt mit sinkendem GA ebenfalls das Morbiditätsrisiko von FG an (9, 10). Häufige Komplikationen sind respiratorische, metabolische, neurologische oder infektiologische Erkrankungen (2, 11-13). Je nach GA stehen in Abhängigkeit von der Entwicklung und Unreife der Organe unterschiedliche Pathologien und damit Erkrankungen im Vordergrund. Sogar eine Geburt in der 38. bzw. 39. SSW geht mit einem erhöhten Mortalitäts- und Morbiditätsrisiko im Vergleich zu Reifgeborenen (RG) mit Geburt mit 40 Gestationswochen einher (14).

Die Überlebensrate von ExtFG und SehrFG hat sich seit den 90er Jahren durch Fortschritte in der medizinischen Versorgung (präinatale Kortikosteroide (15), Beatmung, Surfactant (16), Zugang zu Intensivstationen (17)) stark verbessert (9, 18). Trotz des insgesamt geringen Anteils an FG mit Geburt vor 32 SSW (15%), machen diese den Großteil der Todesfälle aus (Mortalitätsrate von 30-50%) (19, 20). Unter ExtFG ist „Unreife“ die führende Ursache, gefolgt von pulmonalen Erkrankungen (21). Dabei sind insbesondere das Respiratory Distress-Syndrom (RDS, 95-86% bei Geburt < 28 SSW) sowie die Bronchopulmonale Dysplasie (BPD, 67-37% bei Geburt < 30 SSW) zu nennen (22).

Bis zu 60% der ExtFG entwickeln während ihres Krankenhausaufenthalts mindestens einmal eine bakterielle Infektion (23). Intrauterine und perinatale Infektionen stellen wichtige Risikofaktoren der Frühgeburtlichkeit dar und tragen durch eine systemische Inflammation zu 40% der Frühgeburten bei (24). Late-Onset Sepsis und wiederkehrende Bakteriämien führen zu einem erhöhten Risiko für eine Schädigung der weißen Hirnmasse sowie neurologischen Funktionseinschränkungen (25). Neben dem Gehirn ist auch die frühe Entwicklung anderer Organe, wie z.B. der Lunge, der Niere oder des Auges, anfällig gegenüber inflammatorischen und hypoxisch-ischämischen Prozessen (26-29). V.a. ExtFG leiden neben der bereits genannten BPD an einer Retinopathia praematurorum (ROP) und erkranken vergleichsweise häufiger an einer nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) (14, 20, 21). BPD und ROP sind unter anderem durch eine inflammatorische Kaskade im Rahmen der Exposition gegenüber Sauerstoff und/oder der mechanischen Ventilation bedingt. Dagegen trägt eine hyperinflammatorische Immunreaktionen gegenüber intestinalen Bakterien zu der Entstehung der NEC bei (30).

Mit sinkendem GA steigt ebenfalls das Risiko für entwicklungsneurologische Defizite sowie visuelle und auditorische Beeinträchtigungen (9, 20). FG, die vor 25 SSW geboren wurden, zeigen signifikant häufiger motorische und insbesondere kognitive Defizite in einem Alter von 30 Monaten als bei Geburt nach 28 SSW. Im sechsten Lebensjahr leiden 40% der ehemals ExtFG an kognitiven Einschränkungen. Jungen sind dabei stärker betroffen als Mädchen (31). Klinisch werden oft eine periventrikuläre Leukomalazie (PVL) oder intraventrikuläre Hämorrhagie (IVH) diagnostiziert (20, 21). Epidemiologische Studien sehen einen Zusammenhang zwischen neonataler Inflammation und neurologischen Langzeitfolgen (30).

Im Vergleich zu RG haben SpätFG ein 3 bis 5-fach erhöhtes Mortalitätsrisiko im Neugeborenenalter (10, 32, 33). Zusätzlich besteht ein bis zu 4-fach erhöhtes Risiko für medizinische Komplikationen und eine höhere Rehospitalisierungsrate in den ersten Lebensmonaten (32, 34). Neben Temperaturinstabilität, Hypoglykämien, Kernikterus, Trinkschwäche oder epileptischen Anfällen wird bei SpätFG als eines der häufigsten Komplikationen ein RDS diagnostiziert, wenn auch in einer geringeren Häufigkeit im Vergleich zu ExtFG und SehrFG (9, 32, 34-39).

Frühgeburtlichkeit geht nicht nur mit einer erhöhten finanziellen Belastung des Gesundheitswesens einher (40), sondern ist vielmehr mit einer erhöhten Morbidität auch im Kindes-, Jugend- und Erwachsenenalter assoziiert. Eine Rolle spielen dabei vor allem Entwicklungsdefizite in den Bereichen Motorik, Sprache oder soziales Verhalten (13, 41-43) oder eine verminderte Lungenfunktion im Kindes- und Jugendalter (44, 45). Im Erwachsenenalter konnte ein erhöhtes Risiko für u.a. kardiovaskuläre, metabolische bzw. endokrinologische und neurologische Erkrankungen sowie chronischer Niereninsuffizienz identifiziert werden (9, 20, 29, 46-51).

Aufgrund der Zunahme der Frühgeburtlichkeitsrate bei gleichzeitig steigender Überlebensrate der (extrem frühen) FG (17) in Zusammenhang mit der hohen Morbidität nicht nur im Neugeborenen- sondern auch Erwachsenenalter, wird die Notwendigkeit besserer Therapie- und Präventionsmöglichkeiten immer deutlicher. Essenziell hierfür sind das bessere Verständnis von Frühgeburtlichkeit und der (patho-)physiologischen Entwicklung von FG als Grundlage für das Verständnis von Erkrankungen und damit möglichen Therapieansätzen.

### **1.3 Organogenese**

Biologische Ursache für die erhöhte Anfälligkeit der FG im Vergleich zu RG ist die Unreife vieler Organe durch die verkürzte intrauterine Reifung. Insbesondere die Lunge und das Gehirn zeigen eine erhöhte Vulnerabilität (52, 53).

### 1.3.1 Entwicklung des Gehirns

Im dritten Trimester findet eine erhebliche neurologische Entwicklung statt (54, 55). Diese beinhaltet neben einem bedeutenden Anteil dendritischer und axonaler Verzweigung, eine Differenzierung und Proliferation von Gliazellen, Synapsenbildung und Myelinisierung (20, 55). Infolge dieser Prozesse kommt es zu einer 4 bis 5-fachen Zunahme der kortikalen grauen und weißen Hirnmasse (20). Bei einem GA von 30 Wochen hat das Gehirn nur 50% des cerebralen Gewichts von RG erreicht, das Cerebellum nur 35-40% (20).

Das Hirnrindenwachstum wird v.a. durch eine Zunahme der Oberfläche und weniger der Dicke erreicht, was in einer Fältelung der Hirnrinde resultiert. Mithilfe von MRT-Bildgebungsverfahren konnte eine positive Korrelation zwischen GA und Hirnrindenoberfläche bzw. kortikaler Fältelung gezeigt werden (55-58). Die Migration der Neuronen in den Cortex erfolgt entlang radialer Gliazellen und ist bis 25 SSW weitgehendst abgeschlossen (55, 56, 59). Die Migration der Gliazellen dagegen findet weiter bis ins dritte Trimester statt (55, 56). Die Zunahme der Assoziationsfasern und Bildung von Synapsen spielt vor allem in der späten intrauterinen Entwicklung und dem frühen postnatalen Leben eine wichtige Rolle für die Feinabstimmung des kortikalen Wachstums (58, 60). Die sechs Schichten des Neocortex sind gegen Ende des 2. Trimesters ausgebildet. Ab dem 7. Monat entstehen die verschiedenen Rindenareale (motorisch, sensibel, ...). Die definitive Zytoarchitektur wird erst um die 35. SSW erreicht (61).

Frühgeburtlichkeit unterbricht das koordinierte Wachstum des gesamten Gehirns innerhalb eines kritischen Zeitraums (60) und stört die Bildung komplexer mikrostruktureller Verbindungen (62). Gliale Vorläuferzellen reifen nicht zu myelinisierenden Oligodendrozyten heran und es kommt zu einer verminderten Synapsenbildung und einer Vereinfachung des neuronalen Dendritenbaums. Dies resultiert in einem verminderten kortikalen und subkortikalen Wachstum sowie gestörten neuronalen Verbindungen (63, 64). Im Vergleich zu RG zeigten sich im Gehirn von FG u.a. veränderte thalamokortikale Bahnen (57). Insgesamt konnte eine Assoziation zwischen abnehmendem GA und beidseitig reduziertem Volumen von Thalamus, Hippocampus, orbitofrontalem und posterioem Kortex hergestellt werden (65). Eine atypische Hirnmorphologie von FG ist auch bei fehlender Hirnschädigung (z.B. IVH) die Folge (60).

Die frühe Exposition gegenüber der extrauterinen Umwelt i.R. der Frühgeburtlichkeit sowie intrauterine Faktoren stellen potentiell schädigende Risikofaktoren dar (66). Ein Fokus liegt insbesondere auf dem Einfluss von akuter und chronischer Hypoxie sowie inflammatorischen Ereignissen. Eine maternale und intrauterine Infektion bzw. Inflammation wird mit einer perinatalen Schädigung des Gehirns assoziiert und mit der Entstehung von Läsionen der weißen Hirnmasse bzw. der Periventriculären Leukomalazie (PVL) in Zusammenhang gebracht (52, 54, 67). Als Reaktion auf ascendierende Mikroorganismen werden proinflammatorische Zytokine (TNF-alpha, IL-6, IF-gamma) vermehrt

von Makrophagen und/oder Astrozyten der geschädigten Hirnregion exprimiert. Die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke wird erhöht und Leukozyten können in das Gehirn eintreten. Mikroglia und Astrozyten werden aktiviert und eine proinflammatorische Kaskade wird in Gang gesetzt (64, 66).

Die PVL zeichnet sich durch eine multifokale Nekrose der weißen Substanz insbesondere in den an die Ventrikel angrenzenden Areale aus (68). Post mortem und experimentelle Daten bringen die Entstehung der PVL mit einem Arrest der Oligodendrozyten-Entwicklung in Verbindung (69, 70). Eine gestörte Myelinisierung ist die Folge (64). Eine mögliche Ursache scheint die Anfälligkeit unreifer Oligodendrozyten gegenüber reaktiven Sauerstoffradikalen zu sein (52), was durch Infektion, Hypoxie, intrauterine Wachstumsretardierung und epigenetischer Mechanismen zusätzlich negativ beeinflusst wird (63, 71). Die selektive Anfälligkeit von Neuronen gegenüber oxidativem Stress besteht im Gegensatz dazu nur bei RG (64). Klinisch ist eine hypoxisch-ischämischen Encephalopathie (HIE) die Folge.

Die Retinopathia praematurorum (ROP) ist eine neurovaskuläre Erkrankung, die die unreife Retina betrifft und zu einer Ablösung der Retina mit daraus resultierender Blindheit führen kann. Die Inzidenz kann Werte bis zu 73% erreichen. Faktoren wie Hyperoxie unterdrücken Wachstumsfaktoren, wodurch die retinale Vaskularisation beeinträchtigt wird. Die Retina wird infolge unzureichend mit Sauerstoff versorgt. Dadurch wiederum wird die Vasoproliferation durch Wachstumsfaktoren angeregt, was zu einer Ablösung der Retina führen kann (72).

### **1.3.2 Entwicklung der Lunge**

Die physiologische Entwicklung der Lunge erfolgt größtenteils intrauterin und folgt einer Reihe aufeinander abgestimmter Ereignisse, die durch eine Frühgeburtlichkeit signifikant verändert werden.

Der Bronchialbaum verzweigt sich bis zu 16 SSW. Durch die Formierung der luftleitenden Atemwege und terminalen Bronchiolen bis zu 23 SSW wird die Grundlage für den Gasaustausch geschaffen. Kuboidale Epithelzellen differenzieren sich zu Typ I- und II Pneumozyten und Typ II-Pneumozyten beginnen mit der Produktion von Surfactant. Surfactant ist ein Komplex aus Lipoproteinen. Es reduziert die Oberflächenspannung am Luft-Wasser-Übergang und minimiert so die Kollapsneigung der Alveolen (73). Pneumozyten können bereits ab 22 SSW nachgewiesen werden, werden aber erst ab 34 bis 36 SSW prominent. Ab 23 SSW nimmt die Anzahl der Sakkuli und Alveolen zu. Diese reifen in ihrer Funktion für den Gasaustausch heran und die Wanddicke der Alveolen nimmt ab. Reife Alveolen sind jedoch bis zur 37. SSW noch nicht flächendeckend vorhanden (20, 22, 32, 73, 74). Die Vaskularisation der Lunge findet zwischen 16 und 23 SSW statt. Die Kapillarisation distaler Lungenabschnitte erfolgt nach ca. 20 SSW. In diesem Zeitraum kann eine Schädigung der Lunge (z.B. durch Frühgeburtlichkeit) zu einer irreversiblen pulmonalen Gefäßschädigung führen und mit einem verzögerten Wachstum der Alveolen einhergehen (20, 22).

Die Lunge ist intrauterin mit Flüssigkeit gefüllt. Ein Teil wird im Rahmen des natürlichen Geburtsvorgangs durch den entstehenden Druck herausgepresst. Eine viel wichtigere Rolle spielt allerdings der ENaC-Kanal (epithelium sodium channel) an der apikalen Zellmembran der Pneumozyten Typ I und II. Dieser transportiert Na aus dem Alveolarlumen in die Zelle und ist somit für den transepithelialen Transport der Flüssigkeit aus der fetalen Lunge verantwortlich. Die höchste Anzahl an ENaC-Kanälen wird mit ca. 40 SSW exprimiert. Unreife Mechanismen des Na-Transports begünstigen die Entwicklung von Tachypnoe und RDS beim Neugeborenen (75).

Bereits die kleinste Exposition gegenüber schädigenden Faktoren (z.B. Inflammation, Infektion, Barotrauma durch mechanische Ventilation oder Hyperoxie durch Sauerstofftherapie) in einer frühen Entwicklungsphase kann die physiologischen Prozesse der Alveolarisierung und des pulmonalen Gefäßwachstums beeinträchtigen und die Lungenmorphologie negativ verändern (20, 27, 32, 76). Pathologisch können infolge der Frühgeburtlichkeit eine geringere Septierung der Alveolen, weniger, aber größere Alveolen sowie ein abnormales Gefäßwachstum beobachtet werden. Dies resultiert in einer geringeren Gasaustauschfläche (20, 22). Neben einem ineffizienten Gasaustausch wird die unreife Lunge mit einem Surfactant-Mangel und einer verspäteten bzw. verminderten intrapulmonalen Flüssigkeitsabsorption assoziiert (73).

Klinisch spiegeln sich die strukturellen Defizite der Lunge im Rahmen einer Frühgeburtlichkeit insbesondere in der Manifestation von zwei pulmonalen Erkrankungen wider. Das Respiratory Distress-Syndrom (RDS) wird klinisch durch eine Tachypnoe und Zeichen der Dyspnoe (z.B. Nasenflügeln oder Brustwandretraktionen) sowie röntgenologisch durch Milchglas-Opazitäten der Lunge charakterisiert. Ursächlich liegt ein Surfactant-Mangel in Kombination mit der strukturellen Unreife der Alveolen zu Grunde (76). Die Bronchopulmonale Dysplasie (BPD) wird als chronische Lungenerkrankung mit einem Sauerstoffbedarf über 36 Gestationswochen hinaus definiert (76). Durch die Exposition gegenüber hohen Sauerstoff-Konzentrationen und die Druckbelastung im Rahmen der mechanischen Ventilation wird eine inflammatorische Kaskade in Gang gesetzt, die zu strukturellen Veränderungen der Lunge führt (20, 22).

### **1.3.3 Entwicklung der Niere**

Die Entwicklung der menschlichen Niere ist ein sehr komplexer, z.T. noch unbekannter Prozess (77). Die Anzahl der Nephrone, die funktionelle Einheit der Niere, ist eine wichtige Variable bzw. Kenngröße für die renalen Reifung, die Nierenfunktion sowie die Entstehung von Nierenerkrankungen (29, 78). Im dritten Trimester der Schwangerschaft findet mit der Entwicklung von über 60% aller Nephrone der Großteil der fetalen Nephrogenese statt (29, 48, 79).

Eine frühzeitige Geburt vor 34 SSW beeinflusst die strukturelle Entwicklung der Niere (Nephro- und Glomerulogenese) (29). Morphologisches Korrelat der Frühgeburtlichkeit ist die reduzierte Anzahl an Nephronen, die das gesamte Leben über persistiert (51, 77, 79, 80) und mit der Entwicklung von Hypertension und progressiver Nierenerkrankung assoziiert ist (48, 78). Obwohl eine aktive Glomerulogenese bei FG im Gegensatz zu RG noch für eine kurze Zeit (3 bis 4 Wochen) nach der Geburt persistiert, kann eine Oligonephropathie, die durch Frühgeburtlichkeit entsteht, nicht vollständig kompensiert werden (77, 78, 81, 82). Zusätzlich können oft abnorm geformte Glomeruli beobachtet werden. Die Lokalisation ausschließlich in der Nierenrinde lässt darauf schließen, dass es sich um kürzlich extrauterin gebildete Glomeruli handelt (82). Diese sind kaum vaskularisiert und deshalb nur fraglich funktionell (29). Eine aktive extrauterine Nephrogenese sollte deshalb durch geschicktes klinisches Management unterstützt werden und schädigende renale Einflussfaktoren wie z.B. nephrotoxische Medikamente (in utero oder postnatal verabreicht), Hyperoxie, Hyperglykämie der Mutter oder Teratogene wie Alkohol oder Zigarettenrauch minimiert werden (29, 79, 83).

#### **1.3.4 Entwicklung des Herzens**

Das Herz-Kreislauf-System ist das erste funktionsfähige System des Embryos. Die Herzaktion beginnt mit ca. 28 Tagen. Die Herzentwicklung beginnt in der Halsregion in der kardiogenen Zone. Dort entstehen zunächst die paarigen Herzscläuche, die miteinander verschmelzen und den unpaaren primitiven Herzscllauch bilden. Durch Schleifen- und Septumbildung bilden sich die Binnenräume des Herzens. Sie entwickeln sich in die umliegende Zölomhöhle, die spätere Perikardhöhle, hinein. Das Myokard wird durch das den Herzscllauch umgebende Mesoderm gebildet (84).

Kongenitale Herzerkrankungen sind die häufigsten angeborenen Fehlbildungen, die bei fast 1% der Neugeborenen auftreten (85). FG haben ein ca. doppelt so hohes Risiko als RG (86). Am häufigsten wird der Ventrikelseptumdefekt (VSD) mit ca. 35% diagnostiziert. Der Vorhofseptumdefekt (ASD) ist bei 7 bis 10% der Neugeborenen beobachtbar (87). Extrakardiale Anomalien (insbesondere strukturelle Gehirnanomalien) treten unter den verschiedenen Typen der angeborenen Herzfehler v.a. bei Kindern mit VSD und/oder ASD auf (88). So konnte bei Feten mit einer kongenitalen Herzerkrankung eine verminderte Reifung des Gehirns (u.a. Synaptogenese) während des dritten Trimesters beobachtet werden (89, 90).

Der Ductus arteriosus beschreibt eine fetale Shuntverbindung zwischen der Aorta und der Pulmonalarterie. Er spielt somit eine entscheidende Rolle in der fetalen Zirkulation (91). Durch eine Konstriktion der glatten Muskulatur kommt es i.d.R. 18 bis 24 Stunden nach Geburt zu einem spontanen, zunächst „funktionellen“ Verschluss, der bis zur 2. bis 3. Lebenswoche abgeschlossen ist. Ein unvollständiger

oder verzögerter Verschluss wird als Persistierender Ductus arteriosus (PDA) bezeichnet (92). Der PDA kommt mit einer Inzidenz von 20-60% bei FG im Vergleich zu RG (0,2-0,4%) häufiger vor (93).

#### **1.4 Blutgerinnung**

Die Blutgerinnung wird in eine primäre und sekundäre Hämostase unterteilt. Bei der primären Hämostase lagern sich Thrombozyten (Blutplättchen) durch die Bindung von von-Willebrand-Faktor (vWF) an den Thrombozyten-Rezeptor GP IB auf der Wunde an und bilden den sog. weißen Thrombus, um die Wunde abzudichten. Zusätzlich werden aus den Thrombozyten Mediatoren freigesetzt, die zur Thrombozytenaggregation und -quervernetzung beitragen (u.a. Fibrinogen, Fibronektin, Thrombospondin) und zum anderen eine Vasokonstriktion (Thromboxan A<sub>2</sub>) bewirken (94).

Es folgt die sekundäre Hämostase. Durch den weißen Thrombozytenthrombus wird die Gerinnungskaskade in Gang gesetzt. Die Gerinnungsfaktoren aktivieren sich durch ihre Proteaseaktivität und verstärken sich im Verlauf gegenseitig. Letztlich kommt es zur Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin, was den stabilen Wundverschluss gewährleistet. Die Aktivierung erfolgt extrinsisch über eine Gewebläsion oder intrinsisch durch intravasale gelegene Faktoren (94).

Um eine generalisierte Gerinnung zu verhindern, wird die Aktivität der Serin-Protasen durch körpereigene Proteine (z.T. Antithrombin-III, Heparin, Thrombomodulin, Protein C und S oder  $\alpha$ 2-Makroglobulin) durch Komplexbildung oder Änderung ihrer Spezifität gehemmt (94).

Das Blutgerinnungssystem von Neugeborenen unterscheidet sich deutlich von dem Erwachsener (95). Bei einer Untersuchung von Neugeborenen auf 8 verschiedenen Intensivstationen wurden bei 25% im Verlauf Blutungskomplikationen diagnostiziert, von denen 11% als schwerwiegend eingestuft wurden. In derselben Studienpopulation zeigten FG mit einem GA < 28 SSW ein vierfach höheres Blutungsrisiko im Vergleich zu FG, die nach 28 SSW geboren wurden (96). 15-25% der SehrFG bzw. ExtFG erleiden in der ersten Lebenswoche eine IVH (97). (Patho-)physiologisch ist die Thrombozytenzahl und -funktion sowie Konzentration der Gerinnungsfaktoren in FG im Vergleich zu RG vermindert und folgt einer GA-abhängigen Entwicklung (98, 99).

#### **1.5 Immunsystems**

Das Immunsystem besteht aus einer zellulären und humoralen Komponente. Insgesamt arbeiten zwei Mechanismen eng miteinander: das angeborene (natürliche) und das adaptive (erworbene) Immunsystem (100).

Das angeborene Immunsystem ist die erste Verteidigungslinie gegen exogene Pathogene, entartete oder fremde Zellen. Es reagiert unverzüglich, aber relativ unspezifisch auf potenziell schädigende Faktoren und ist von Geburt an funktionstüchtig. Die humorale Komponente umfasst das Komplement-

system, Opsonine und antimikrobielle Stoffe (100). Zu den Aufgaben des Komplementsystems zählen u.a. die Lyse von Krankheitserregern, die Chemotaxis und Aktivierung von Leukozyten, die Opsonierung von Pathogenen und Fremdkörpern durch die Anlagerung von C3b an Antigen-Antikörper-Komplexe, sowie die Steigerung der Gefäßpermeabilität (101). Die zelluläre angeborene Immunabwehr besteht hauptsächlich aus neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und NK-Zellen. Über bestimmte Oberflächen-Rezeptoren dieser Zellen (*pattern recognition receptors*, **PRRs**) werden pathogene Keime durch deren charakteristische Merkmale (*pathogen associated molecular patterns*, **PAMPs**) erkannt und mittels Phagozytose abgetötet (102). Zusätzlich wird die Freisetzung von proinflammatorischen Interleukinen und chemotaktisch aktiven Substanzen induziert (103). Die Erkennung körperfremder Strukturen wird neben den PRRs durch Opsonierung (Anlagerung von Komplementfaktoren oder Antikörpern) und/oder Antigenpräsentation auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen (Makrophagen oder dendritische Zellen (DC)) ermöglicht (103).

Nach Antigenkontakt werden Zytokine freigesetzt, die das adaptive Immunsystem aktivieren. Dieses reagiert im Gegensatz sehr spezifisch und verstärkt die angeborene Immunantwort (102). Die humorale Immunabwehr wird von B-Lymphozyten getragen, indem diese lösliche Immunglobuline (= Antikörper) produzieren. Diese Immunglobuline binden Antigene und neutralisieren diese entweder direkt oder indirekt über die Aktivierung des Komplementsystems oder Opsonierung (102). Initial sind die Immunglobuline als Antigen-Rezeptor auf der Oberfläche von B-Lymphozyten zu finden (membranständige Immunglobuline= B-Zell-Rezeptor). Nach Bindung eines passenden Antigens kommt es zur Proliferation und Ausdifferenzierung des B-Lymphozyten. Es entstehen Effektorzellen (Plasmazellen), deren Hauptaufgabe die Produktion von Antikörpern ist (104, 105). Im Verlauf bilden die Zellen des adaptiven Immunsystems ein „immunologisches Gedächtnis“, welches bei erneuter Konfrontation mit demselben Pathogen eine sofortige Reaktion der adaptiven Abwehr ermöglicht (100).

Die zellvermittelte Immunabwehr erfolgt mittels T-Lymphozyten (T-Zellen). Diese sind anhand von Oberflächenmolekülen des CD-Systems in 2 Hauptfraktionen unterteilt. CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen haben eine v.a. zytotoxische Aktivität (105). CD4<sup>+</sup>-Zellen (T<sub>H</sub>-Zellen) dagegen werden für die meisten Immunreaktionen benötigt (102). Abhängig vom lokalen Zytokinmuster differenzieren sich T<sub>H</sub>-Zellen in verschiedene Subgruppen. T<sub>H</sub>1-Zellen entstehen im Rahmen von Infektionen mit intrazellulären Keimen und verstärken die Immunreaktion durch die Aktivierung von Makrophagen, NK-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten (102, 105, 106). T<sub>H</sub>2-Zellen dagegen entstehen als Reaktion auf Wurmparasiten und fördern die Aktivität von Eosinophilen, Basophilen und Mastzellen. Zusätzlich unterstützen T<sub>H</sub>2-Zellen die Differenzierung der B-Zelle zur Antikörperproduktion (102, 106). Daneben gibt es weniger erforschte T<sub>H</sub>-Zellen. Regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>) verhindern eine Autoimmunreaktion sowie überschießende Immunantwort gegenüber exogenen Antigenen (106, 107). T<sub>H</sub>17-Zellen haben

eine stark proinflammatorische Wirkung und unterstützen neutrophile Granulozyten in ihrer Abwehr gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze (102).

Das fetale bzw. neonatale Immunsystem steht komplexen immunologischen Anforderungen gegenüber (24). Intrauterin muss eine schädliche inflammatorische Immunantwort vermieden werden, da sie im Rahmen einer alloimmunen fetomaternalen Abstoßungsreaktion zu Frühgeburtlichkeit führen kann (24). Die Suppression der zytotoxischen Eigenschaften steht im Vordergrund. Die T-Zell-Antwort ist in Richtung der  $T_H2$ -Zellen bei reduzierter  $T_H1$ -Zellzahl verschoben und suppressive  $T_{reg}$ -Zellen werden in hoher Anzahl produziert. Eine geringe Anzahl an B-Zellen mit einer verspäteten Produktion von Antikörpern sowie ein antiinflammatorisches Zytokinprofil ist zu beobachten (24, 108, 109). Interessanterweise sind gestörte  $T_{reg}$ -Zellen bei den meisten inflammatorischen Erkrankungen wie NEC, BPD und ROP beteiligt (30).

Diese immunregulatorischen Mechanismen, die eine fetomaternale Toleranz ermöglichen, bleiben insbesondere bei FG postnatal bestehen (30). Intrauterin entwickelt sich das Immunsystem in nahezu steriler Umgebung (110), sodass erst nach der Entbindung eine Anpassung bzw. Immunreaktion auf die Exposition gegenüber Antigenen und Umweltfaktoren notwendig wird (109). Die veränderte Funktionalität des angeborenen Immunsystems in Kombination mit der verminderten  $T_H1$ -Immunreaktion (bzw.  $T_H2$ -Polarisierung) hat eine erhöhte Infektanfälligkeit der Neugeborenen zur Folge. Der genaue Mechanismus ist weiterhin unklar (30, 111). Insbesondere bei FG sind die Abwehrmechanismen in Abhängigkeit des GA minimiert (112). Der frühe Infektionsschutz des Neugeborenen wird durch plazentar übertragene Antikörper (IgG) gewährleistet (109, 113).

Nach der Geburt kommt es als Reaktion auf die postnatale Exposition gegenüber der mikrobiellen Umwelt zu einer altersabhängigen Reifung des Immunsystems (101), die einem stereotypen Muster folgt (114). Die Untersuchung erfolgte bis dato vor allem auf Zellebene (114). Das Immunprofil von FG und RG unterschied sich zunächst, konvergierte jedoch nach ca. 3 Monaten (101, 114). Die Granulozytenzahl unterscheidet FG dabei am meisten von RG und korreliert positiv mit dem GA (30, 114). Neutrophile besitzen im Vergleich zu RG reduzierte chemotaktische und adhäsive Eigenschaften sowie eine verminderte Phagozytosekapazität. Ihre Anzahl nimmt postnatal allmählich ab (115, 116). Die Monozytenzahl und -größe steigt während den ersten 2 Lebenswochen an und nimmt ab der dritten Lebenswoche wieder ab (101, 114). Im Vergleich zu RG bzw. sogar Erwachsenen konnte bei FG ein höherer Monozytenanteil und sogar eine größere Phagozytosekapazität beobachtet werden (101). Monozyten sind bereits bei Geburt funktionell adäquat, zeigen jedoch eine verringerte Chemotaxis (101, 113). Der Anteil der NK-Zellen im Nabelschnurblut steigt mit zunehmendem GA an (101). Untersuchungen der NK-Zellen im Nabelschnurblut haben eine verminderte Zytotoxizität durch

weniger zytoplasmatische Granula, eine geringe Degranulationsfähigkeit, eine geringere Freisetzung von lytischen Faktoren und weniger Perforin- und Granzymingehalte gezeigt (101).

Parallel dazu konnte ab Geburt ein Anstieg der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Zellen beobachtet werden (114). Dem folgte eine Zunahme der B-Zell-Anzahl ab dem ersten Monat (114). Der Reifungsprozess von Lymphozyten ist weitgehend abhängig von Zytokinen. Nachdem jedoch die Zytokinproduktion bei Neugeborenen im Vergleich zu Erwachsenen anders reguliert ist und i.d.R. weniger Zytokine gleichzeitig produziert werden, ist die Funktionsfähigkeit von Lymphozyten beeinträchtigt (105, 113). Neonatale CD4<sup>+</sup> T-Zellen z.B. haben eine intrinsische Unreife aufgrund ihrer verminderten Fähigkeit Gedächtniszellen zu produzieren (105, 113). Die Aktivierung von B-Zellen ist durch eine verminderte Expression von B-Zell-stimulierenden Oberflächen-Rezeptoren, unreife folliculäre dendritische Zellen (DCs), und einer unreifen B-Zell-DC-T-Zell-Interaktion eingeschränkt (117). Diese Mängel können u.a. durch eine geringere Antigen-Exposition begründet werden (113).

## 1.6 Das Proteom

Das Proteom fasst alle Proteine eines Systems zusammen. Diese sind die wichtigsten biochemischen Funktionsträger zellulärer Prozesse (118-120). Proteine sind lange unverzweigte Ketten aus ca. 200 bis 600 Aminosäuren, die über Peptidbindungen miteinander verbunden sind. Ketten von weniger als 50 Aminosäuren werden als Peptide bezeichnet (121).

Genexpression beschreibt die Umsetzung der genetischen Information in RNA und Proteine. Die Proteinbiosynthese verläuft bei Eukaryonten in drei Schritten: Transkription (DNA zu hRNA), Prozessierung (hRNA zu mRNA) und Translation (mRNA zu Protein) (121).

Unter Berücksichtigung von Splicing, Editing, und posttranslationaler Proteinmodifikation enthält Plasma tausende, wenn nicht sogar Millionen von Polypeptidarten mit einer Konzentration von bis zu 10 Größenordnungen (122). Aufgrund des unbekanntes Ausmaßes der genetischen Kontrolle über die Proteinexpression kann keine Aussage getroffen werden, ob die gemessenen Proteinwerte im Plasma rein genetisch (Risiko nicht beeinflussbar) oder phänotypisch (Risiko beeinflussbar) bedingt sind (120).

Blut ist ein essenzielles Transportmedium und ermöglicht durch seine zentrale Rolle in der Physiologie des Menschen eine Kommunikation zwischen entfernten Zellen und (nahezu) allen Organsystemen. Der Vorteil der Kommunikation über das Plasma ist vielfältig: (a) eine Zelle kann mittels Produktion löslicher Faktoren mehrere Zielzellen erreichen. (b) Durch die Präsenz vieler verschiedener löslicher Plasmafaktoren, die von vielen verschiedenen Organen produziert werden, kann die Zelle ein viel globaleres Bild über den Zustand des Organismus erhalten (111). Aus diesem Grund wird die Annahme getroffen, dass Blut auf Proteinebene den Erkrankungszustand, Gewebeschädigung und allgemeinen Gesundheitszustand bzw. Phänotypen eines Menschen widerspiegelt (123).

Genetische Marker können aufgrund der relativen Stabilität des Genoms über alle Zellen des Körpers in nahezu jedem Zellsystem (Haut, Lymphozyten, ...) mit ähnlichem Ergebnis gesammelt werden (Genomics). Allerdings lässt sich damit nur auf den Genotypen schließen und es kann keine Aussage über die Regulation biologischer Prozesse in Abhängigkeit von Lebensstil, Erkrankungen oder Medikamenten getroffen werden, wie es auf mRNA und -Proteinebene möglich ist (Transcriptomics und Proteomics) (120). Proteine stellen das Endprodukt der Genexpression dar, weshalb mittels Proteomics am besten eine Aussage über den funktionellen Zustand eines Organismus getroffen werden kann (124).

Zu den zellulären Bestandteilen des Blutes zählen Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten. Der nicht-zelluläre (flüssige) Anteil wird als Plasma bezeichnet. Das Plasmaproteom ist das komplexeste menschliche Proteom, da es neben Plasmaproteinen auch Proteine aus anderen Geweben enthält (120). Sie umfassen einen Konzentrationsbereich von mehr als 10 Größenordnungen (123). Plasmaproteine, die eine funktionelle Rolle im Blut haben, machen den größten Anteil aus. Dazu zählen Albumin (ca. 55% der gesamten Proteinmenge), Apolipoproteine, Proteine der Komplement- und Gerinnungskaskade sowie Akute-Phase-Proteine des angeborenen Immunsystems (123). Diese Proteine werden v.a. durch die Leber und den Darm synthetisiert und in das Plasma sekretiert. Sie haben i.d.R. eine molekulare Masse größer 45 kDA, sodass sie die Nierenfiltrationsgrenze nicht unterschreiten und infolgedessen eine längere Plasmahalbwertszeit haben (120). Die zweite Klasse beschreibt Proteine, die u.a. im Rahmen von Gewebeschädigung oder Zelltod ins Blut sekretiert werden (z.B. ASAT oder ALAT durch die Leber). Die letzte Klasse umfasst Signalmoleküle, wie kleine Hormone und Zytokine, die nur in geringeren Konzentrationen im Blut vorhanden sind und bei Bedarf hochreguliert werden (120, 123). Im Gegensatz zu Plasmaproteinen haben diese Proteine für gewöhnlich aufgrund ihrer molekularen Größe eine kürzere Halbwertszeit, da sie den renalen Filter passieren können (120). Bei der Analyse von Vollblut (wie auch im Rahmen von Trockenblutproben) sind zusätzlich Proteine aus Erythrozyten (v.a. Hämoglobin), Thrombozyten und Leukozyten vorhanden (125, 126).

In vorherigen Studien waren große interindividuelle Unterschiede erkennbar. Im longitudinalen Follow-Up des Einzelnen zeigte sich das Blutproteom intraindividuell weitaus konstanter (geringere intraindividuelle Unterschiede) (125, 127-129).

Das Verständnis, dass jedes Protein eine einzige spezifische Funktion hat, ist längst überholt (122). Vielmehr werden einem Protein mehrere Funktionen in unterschiedlichen biologischen Systemen zugeschrieben. Die Beschreibung des gesamten Proteoms in seiner Struktur, Funktion und Dynamik ist somit grundlegend für das Verständnis der biologischen Prozesse (118).

## 1.7 Biomarker

Biomarker werden definiert als Indikatoren für physiologische oder pathologische Prozesse oder sind charakterisiert durch eine Reaktion auf Exposition oder Intervention (FDA-NIH: Biomarker-Working-Group, 2016).

Um Biomarker massenspektrometrisch zu detektieren, muss das Studiendesign mit Bedacht erfolgen. Im Rahmen bisheriger Studiendesigns wurde eine vergleichsweise kleine Probenanzahl massenspektrometrisch umfangreich nach Biomarkern analysiert und einzelne mögliche Biomarkerkandidaten anschließend an einer großen Kohorte mittels Immunoassays validiert (123). Mit dem „rectangular approach“ führte Geyer et al. eine neue Herangehensweise für massenspektrometrisch-basierte Biomarker-Studien ein, welche durch zwei oder mehr große Kohorten charakterisiert ist. Die sich überdeckenden Proteine aus beiden Studienarmen (Kohorten) können zu einer hohen Wahrscheinlichkeit als Biomarker herangezogen werden, da studienspezifische Treffer ausgeschlossen werden können (123). Zusätzlich wird nicht nur ein potentieller Biomarker betrachtet, sondern es können vielmehr für bestimmte Erkrankungen bzw. klinische Fragestellungen charakteristische Proteinmuster detektiert werden (123). Dabei muss die Wahl der Kohorten ausreichend groß erfolgen, um eine statistische Signifikanz der Treffer zu sichern (130-132).

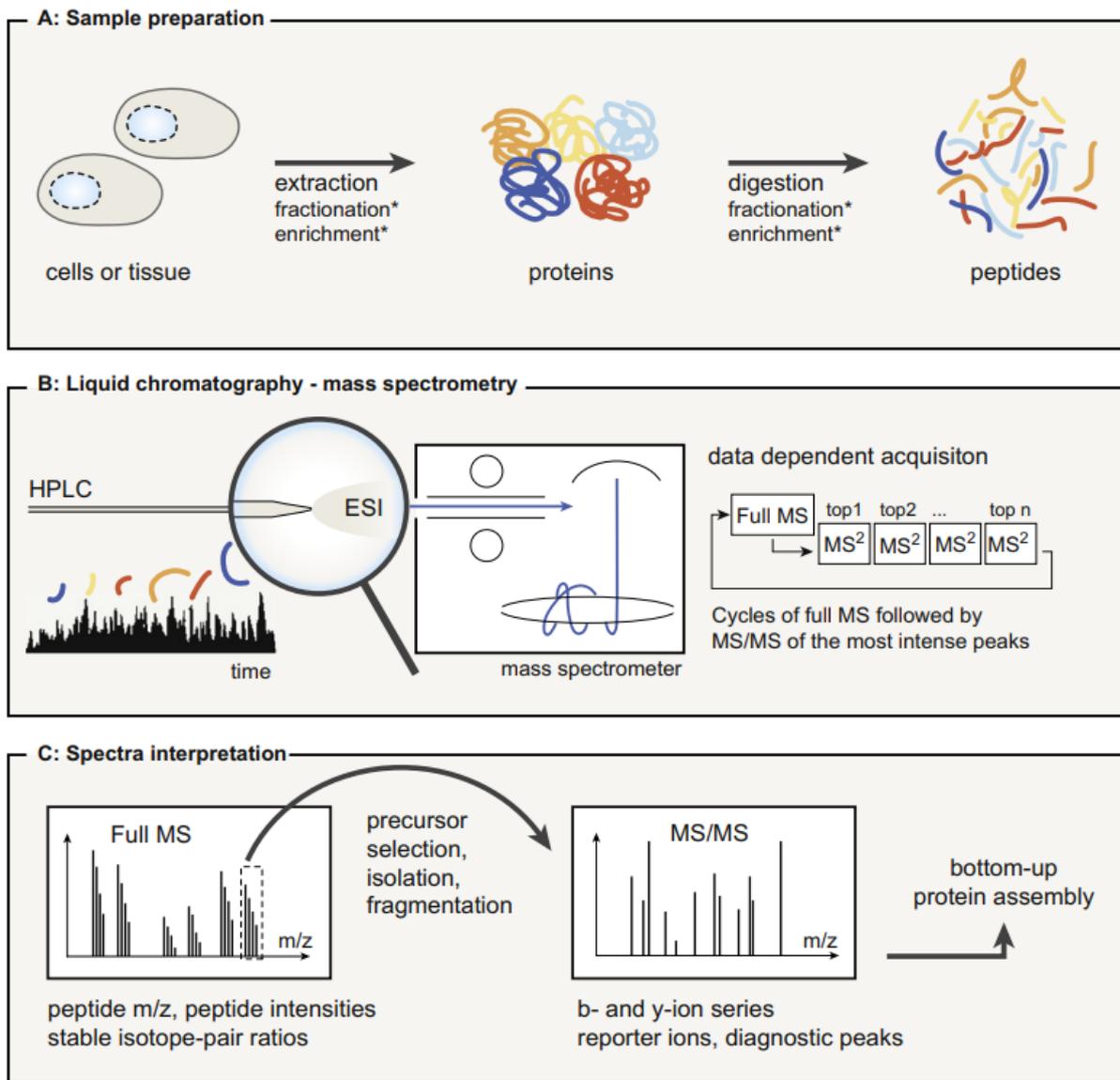
Proteom-Analysen profitieren stark von klinischen Informationen, wie z.B. anthropometrische Daten, klinische Laborergebnisse oder Patientenfragebogen. Unterschiede zwischen den Kohorten können durch Korrelation der Metadaten mit bekannten Markern detektiert werden und so eine mögliche Missinterpretation des Ergebnisses verhindert werden. Die Korrelation von klinischen und Proteom-Daten kann einen neuen Einblick in die Daten ermöglichen.

## 1.8 Massenspektrometrie

Nachdem Neugeborenen nur eine geringe Menge an Blut entnommen werden kann, steht die Analyse der Entwicklung der FG auf Proteinebene einigen limitierender Faktoren gegenüber. Während der letzten Jahrzehnte hat die Massenspektrometrie (MS)-basierte Analyse des Blutproteoms an großem Stellenwert gewonnen, um biologische Systemanalysen durchzuführen und neue Biomarker zu entdecken (118, 122). MS-basierte Proteomik ermöglicht tausende von Proteinen in kürzester Zeit (unter einer Stunde) in einer unvoreingenommenen, hypothesenfreien Herangehensweise zu messen; d.h. die Identität der erwarteten Proteine muss im Vorhinein nicht bekannt sein (118). Vor allem bei Erwachsenen wurden bereits zahlreiche klinische Studien anhand von Blut, anderen Körperflüssigkeiten und Gewebe durchgeführt (127, 133-138). Die Nutzung von Trockenblutproben auf Filterkarten, die mittels Fersenstich oder venöser Punktion generiert werden, findet im Bereich des Neugeborenen-

screenings (NGS) schon flächendeckend Anwendung. Der Vorteil liegt in der minimalen Invasivität und der leichten Handhabung im klinischen Alltag. Um den Probentyp der MS zugänglich zu machen, werden kleine Flächen aus den Trockenblutproben ausgestanzt und die Proteine gelöst (126, 139). Die Methode der MS ist sehr sensitiv, sodass nur geringe Mengen Blut oder Blutplasma (1  $\mu$ l) benötigt werden, um hunderte Proteine zu untersuchen und Veränderungen der Proteinexpression in Abhängigkeit von Alter und Erkrankungen zu identifizieren (140).

Das grundlegende Konzept der MS-basierten „Bottom-up“-Proteomik besteht darin, Proteine enzymatisch in Peptide zu verdauen. Diese werden im MS analysiert und dabei quasi sequenziert. Mittels spezieller Software wird zunächst die Aminosäuresequenz der Peptide identifiziert und diese den Proteinen des humanen Proteoms zugeordnet (Abb. 1). Dabei wird aus der zusätzlich stattfindenden Quantifizierung des gemessenen Signals der Peptide eine Quantifizierung der Proteine berechnet. Prinzipiell können mittels MS alle Proteine eines Systems quantifiziert werden, wobei die Sensitivitätsgrenze bei der Identifikation von Proteinen von deren Abundanz, der dynamischen Spannbreite der Probe und der Tiefe der proteomischen Messung abhängt (118). Enzymatisch- und affinitätsbasierte Methoden sind mit Problemen der Kreuzreaktivität oder Beeinträchtigungen durch andere Moleküle (z.B. Triglyceride) konfrontiert (141). Diese haben bei der MS basierten Proteinanalyse wenig Einfluss. Zusammengefasst ist die MS eine hoch spezifische, sequenzbasierte Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen (123).



**Abbildung 1: Proteomik-Arbeitsfluss**

(A) In der Probenaufbereitung der Bottom-Up Proteomik werden die Proteine aus dem biologischen Material extrahiert und durch enzymatische Spaltung in Peptide verdaut. B) Die aufgereinigten Peptide werden mittels HPLC in der Zeitdimension separiert und mittels ESI in das MS überführt. Die Proteine werden durch den Massenfilter (Quadrupol) separiert und den Massenanalysator (Orbitrap) detektiert. Je nach Scanmodus werden einzelne oder multiple Ionen fragmentiert und die fragmentierten Ionen detektiert. In der Abbildung ist die Messung mittels Data-Dependent-Aquisitionsmodus (DDA) dargestellt. Nach einem vollständigen MS-Scan werden die Peptide mit der größten Intensität isoliert und weiter fragmentiert, um sog. MS/MS-Spektren (MS<sup>2</sup>) zu generieren. C) Die MS-Spektren werden in Rohdateien gespeichert und durch eine spezielle Software interpretiert, die Peptide anhand der MS<sup>1</sup> Ionenvorläufer-Masse und Fragmentation-Information erkennt. Mittels Softwarepaketen kann auf die Peptide bzw. Proteine geschlossen werden (Abbildung aus (142)).

Moderne Massenspektrometer, die in der Proteomik Anwendung finden, sind komplexe Hybridgeräte und vereinen mehrere Bauteile zum Isolieren und Analysieren von Ionen in sich. Grundsätzlich sind allen verwendeten Typen von MS mehrere Funktionen gemein (Abb. 2):

(1) Eine *Ionenquelle*, in der Moleküle eine oder mehrere Ladungen aufnehmen können (Ionisierung) und anschließend als Ion in die Gasphase überführt werden. Für Proteine und Peptide werden sog. sanfte Methoden zur Ionisierung verwendet. Bei diesen unterscheidet man zwischen der Elektrospray-ionisation (ESI) und der Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI). ESI verwendet flüssige Proben, welche von einem Emitter gesprüht werden. Bei MALDI hingegen werden Analyte in eine kristalline Matrix getrocknet, welche durch Laserpulse verdampft wird. ESI kann als kontinuierliche Quelle an Flüssigkeitschromatographiemethoden gekoppelt werden, weshalb in der Analyse komplexer Proben, wie des Blutproteoms, hauptsächlich ESI Anwendung findet.

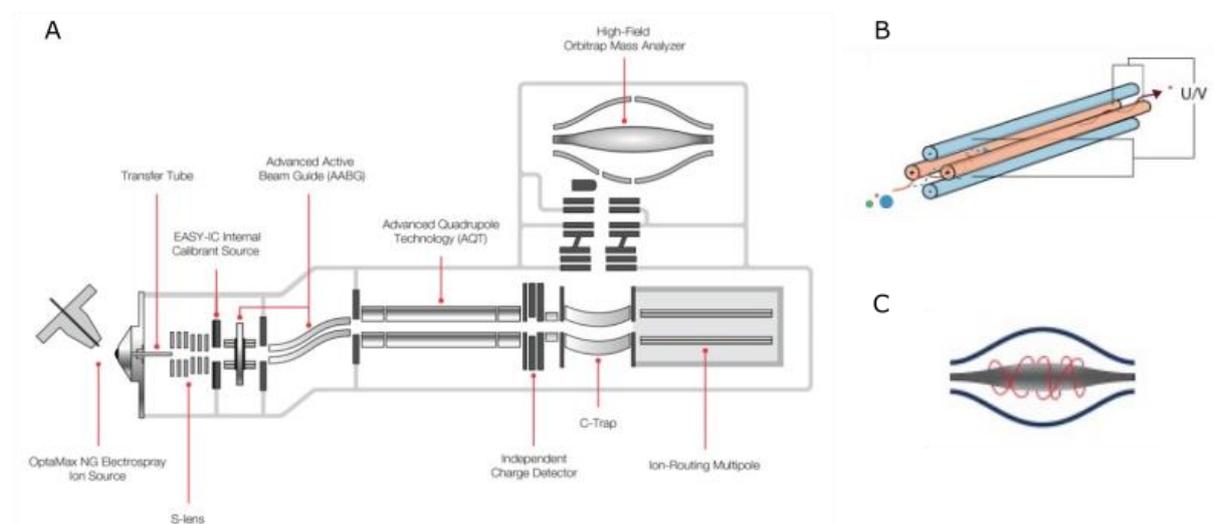
(2) Ein *Massenfilter*, in dem die Ionen nach einem bestimmten Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ -Ratio) selektiert bzw. gefiltert werden können. Dabei handelt es sich fast immer um einen Quadrupol. Dieses besteht aus 4 parallel zueinander angeordneten Stabelektroden, die in der orthogonal zur Zylinderachse liegenden Ebene ein Quadrat bilden. Durch das entstehende elektrische Wechselfeld werden die Ionen anhand ihrer  $m/z$ -Ratio selektiert, sodass nur Ionen einer bestimmten Masse das Feld passieren.

(3) Eine *Fragmentierungszelle* (collision-cell), die es ermöglicht aus den bereits vorselektierten Ionen Bruchstücke von (Peptid-)Ionen zu erzeugen. Unterschiedliche Methoden erzeugen dabei wiederum unterschiedliche Peptidbruchstücke. In der Proteomik ist die ‚*Higher-energy collisional dissociation*‘ gebräuchlich. Ionen werden durch Beschleunigung in einem elektrischen Feld zur Kollision gebracht und hauptsächlich b- und y-Ionenfragmente von Peptiden erzeugt.

(4) Ein *Massenanalysator* mit Detektor, der die  $m/z$ -Ratio jedes Ions und deren Signalstärke misst. Hier besteht der hauptsächlichste Unterschied zwischen den verschiedenen MS-Typen, die zumeist nach dem Analysator benannt werden. Verbreitet sind Ionenfallen, Ionenfilter-Elektronenvervielfacher Kombinationen, Time-of-flight (TOF) Detektoren oder der Orbitrap Detektor. Hierbei kommen zwei Prinzipien zum Einsatz. Zum einen werden die Ionen zeitlich voneinander separiert (TOF-/ Quadrupol-Scan) und die auf der Detektorplatte auftreffenden Ionen so einem  $m/z$ -Verhältnis zugeordnet. Im zweiten Fall werden alle zu analysierenden Ionen gleichzeitig in eine Oszillation gebracht, die anschließend ausgelesen und z.B. mittels Fouriertransformation dekonvolviert wird (Ionenfallen, Orbitrap) (122).

Zur MS-Analyse werden Zyklen aus verschiedenen Scan-Typen im Millisekunden- bis Sekundenbereich gefahren. Man unterscheidet dabei grundsätzlich zwischen MS1 bzw. Precursor-Spektren und MS2 bzw. Fragment-Spektren (auch tandem-MS oder MS/MS). In MS1-Spektren werden die  $m/z$ -Ratios der intakten Analyte gemessen, in MS2-Spektren die  $m/z$ -Ratios von Fragmenten der Precursor. Zur Identifikation der (Peptid-)Ionen muss von diesen ein Fragmentspektrum erstellt werden. Die Steuerung

des MS lässt dabei verschiedene Scanmethoden als Kombination von konsekutiven MS1 und MS2 Scans zu. So können einzelne Ionen, die ohne Fragmentierung (MS1) detektiert wurden, in einem folgenden Scan zur Fragmentierung geplant und dafür in einem engen  $m/z$ -Fenster isoliert werden. Man spricht von Data-Dependent-Aquisition (DDA). Andernfalls können repetitiv immer dieselben  $m/z$ -Bereiche zur Fragmentierung isoliert werden, wobei in jedem MS2-Scan mehrere intakte Ionen zusammen isoliert und fragmentiert werden. Dies nennt man Data-Independent-Aquisition (DIA). In beiden Fällen ergibt sich ein Scanzzyklus aus  $1 \times MS1$  und  $X \times MS2$ , wobei je nach Einstellungen einer dieser Zyklen im Bereich von 100 ms bis wenigen Sekunden liegen kann. Anhand von spezieller Software können aus den generierten Spektren Peptide bzw. Proteine identifiziert und quantifiziert werden (122).



**Abbildung 2: Aufbau eines Massenspektrometers**

Das Massenspektrometer (Abbildung einer Exploris 480) (143) (A) besteht aus 4 hintereinander geschalteten Funktionen: Ionenquelle, Massenfilter (Quadrupol) (144) (B), Fragmentierungszelle und Massen-Analysator (Orbitrap) (144) (C) mit Detektor.

Die gleichzeitige Analyse aller Peptide eines Proteomics-Experiments im MS übersteigt die Kapazität des Massenspektrometers. Aus diesem Grund ist dem Massenspektrometer oft ein kontinuierliches Separationssystem vorgeschaltet, um das Peptidgemisch zu dekomplexieren (122). Das am häufigsten in der Proteomik angewendete Verfahren ist die Reversed-Phase Flüssigkeits-Chromatographie (LC). Diese nutzt die unterschiedlichen hydrophoben Eigenschaften von Peptiden, die durch die Aminosäuren entstehen, um die Peptide nach ihrer Hydrophobizität zu separieren (145). Zusätzlich zur  $m/z$ -Dimension der Analyse entsteht eine Zeitdimension der LC, die es dem MS ermöglicht, zehntausende von Peptiden in einem Experiment zu identifizieren und zu quantifizieren. Die Peptide eluieren dabei in Peaks mit mehreren Sekunden Breite von der Chromatographiesäule, wodurch bei Scanzyklen im sub-Sekundenbereich eine stabile Quantifizierung jedes einzelnen Peptids gewährleistet ist.

## 1.9 Aktueller Stand der Forschung

Ein Großteil der bekannten Plasmaproteine (Komplement, Gerinnung, Apolipoproteine) wurde bereits in den 80er und 90er Jahren mit herkömmlichen Methoden (z.B. ELISA, Immundiffusionstest, Elektroimmunassay) in RG und FG untersucht. Die Studienlage konzentrierte sich insbesondere auf die Etablierung von GA-gemäßen Referenzwerten und auf den Vergleich der Proteinkonzentrationen mit Erwachsenen (95, 98, 146-149). Meist wurde Nabelschnurblut verwendet (150). Neuere Methoden wie MS ermöglichen einen ganzheitlichen Blick auf den (patho-)physiologischen Zustand eines Individuums. Während der Fokus bis vor kurzen noch auf der Analyse des Blutproteoms Erwachsener lag, wuchs das Interesse für Kinder und Neugeborene in den letzten Jahren stark an (151).

Letunica et al. stellen einen guten Überblick über die bisherige Studienlage bei Neugeborenen bereit (152). Ein Großteil der Studien konzentrierte sich auf die Etablierung neuer Biomarker für die typischen Erkrankungen der Neugeborenenperiode. Dazu zählen v.a. Fall-Kontroll-Studien bei Sepsis oder NEC (153-158), pulmonalen Erkrankungen wie RDS oder BPD (159, 160), kardialen Erkrankungen (161-163) oder ROP (164, 165). Ein weiterer Fokus lag in der Veränderung des Proteomprofils durch eine intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR) oder bei einem Geburtsgewicht < 1500g (VLBW) (166-169). Als Material wurde meistens Plasma und nicht Vollblut verwendet (152).

Obwohl die altersabhängige Dynamik der Blutproteine eine wichtige Grundlage darstellt, gibt es bis dato nur eine Hand voll Studien, die einen Blick auf die physiologische Entwicklung des gesamten Blutproteoms werfen. Die Arbeitsgruppe um Suski et al. verglich als eine der ersten das Plasmaproteom von FG mit Geburt < 30 SSW (N=57) mit dem von RG (N= 19) anhand von Nabelschnurblut und betrachtete zusätzlich die postnatale Dynamik anhand eines weiteren Zeitpunkts nach Geburt. So konnte Suski et al. erstmals mittels „einer Messung“ den Einfluss des Gestations- und Lebensalters auf das Komplement, -Gerinnungs-, und -Immunsystem, Immunglobuline und Apolipoproteine aufzeigen (170, 171).

Im weiteren Verlauf wurde ein besonderer Fokus auf die Entwicklung des Plasmaproteoms in der ersten Lebenswoche gelegt (172-174). Diese wird zunehmend als wichtige Determinante für den Gesundheitszustand des Menschen bis ins späte Lebensalter betrachtet (112, 175) und unterliegt auf molekularer Ebene einer großen Dynamik (172). Während Bennike et al. die Proteindynamik in RG betrachtete (173), konzentrierte sich Zhong et al. auf ExtFG (174).

Die Untersuchung der Dynamik des Plasmaproteoms von 30 afrikanischen RG innerhalb der ersten Lebenswoche durch Bennike et al. erfolgte anhand von 4 Zeitpunkten. Insgesamt wurden 60 Blutproben (jeweils 2 pro Neugeborenes) massenspektrometrisch analysiert. Dabei konnte eine Art postnatale Reifung im Sinne zunehmender Konzentrationen von Akute-Phase-Proteinen und Komplement-

faktoren des klassischen Wegs festgestellt werden. Komplementfaktoren des Lektin-Wegs zeigten im Gegensatz dazu eine Abnahme. Ein Vergleich mit dem Transkriptom des Vollbluts zeigte, dass mRNA-Level nicht stellvertretend für die Proteinkonzentration herangezogen werden können. Die dritte große Gruppe an Proteinen umfasste Immunglobuline. Hier konnte eine Zunahme der endogenen IgM-Synthese parallel zu der Abnahme transplazentar übertragener Antikörper vermerkt werden (173).

Zhong et al. untersuchte die Entwicklung des Plasmaproteoms von ExtFG (N=14) mittels Multiplex PEA-Technologie bis zu einem kGA von 40 SSW anhand von 7 Abnahmezeitpunkten. Parallel zu Bennike et al. konnte eine ähnliche Entwicklung auch in ExtFG gezeigt werden. Die Proteine wurden in 7 Cluster unterteilt, die in zu- und abnehmende Proteinintensitäten eingeteilt werden konnten und schon innerhalb der 1. Lebenswoche signifikante Änderungen zeigten. Proteine mit fallender Dynamik schlossen Proteine der Zellproliferation und Plazenta-Morphogenese ein. Eine Untergruppe wurde durch einen Anstieg mit darauffolgendem Abfall charakterisiert und enthielt Strukturproteine, die wahrscheinlich mit der endothelialen Zelladhäsion assoziiert sind. Proteine, die postnatal anstiegen, beinhalteten Proteine des Gerinnungssystems und der Immunregulation (insbesondere der Leukozytenrekrutierung) (174). Dabei wird ersichtlich, dass das Plasmaproteom bereits innerhalb eines kurzen Zeitraums erhebliche Veränderungen durchläuft.

Lee et al. kombinierte darüber hinaus die Analyse des Plasmaproteoms in der ersten Lebenswoche mit weiteren Omic-Technologien. Diese können sich gegenseitig ergänzen und die gleichen biologischen Prozesse auf unterschiedlichen Ebenen widerspiegeln. Die Analyse der mRNA-Konzentration (Transcriptomics) zusammen mit der Zellzusammensetzung zeigte, dass die beobachtete Dynamik der mRNA-Werte nicht nur Folge der veränderten Zellzahlen war. Gene mit einer verminderten Expression innerhalb der ersten Lebenswoche waren beteiligt in der zellulären Reaktion auf Stress, Detoxifikation und reaktiven Sauerstoffspezies als auch der Häm-Biosynthese. Im Gegensatz dazu waren Gene im Zusammenhang mit dem Immunsystem und der Komplementaktivierung hochreguliert. Parallel dazu konnten Proteine der Komplementkaskade und des Hämabbaus in vermehrten Konzentrationen gefunden werden. Bei der Untersuchung des Metaboloms (Metabolomics) zeigten sich v.a. Veränderungen von Plasmasteroiden und Kohlenhydratmetaboliten, die die neurologische Entwicklung, Zellproliferation und vermehrte Nahrungsaufnahme in Neugeborenen widerspiegeln (172).

In zwei weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass sich die postnatale Dynamik der Proteine, insbesondere des Komplement- und Immunsystems, bis ins Kindes- bzw. Erwachsenenalter fortsetzt (176, 177).

### **1.10 Ziel der Studie**

Ziel der Studie war die umfassende massenspektrometrische Analyse des Proteinprofils von FG ab der Grenze der Lebensfähigkeit (> 23 SSW) anhand von Vollblutproben, um grundlegende biologische Veränderungen bzw. Entwicklungsprozesse der FG auf Proteinebene zu beschreiben. Es erfolgte der Vergleich des Proteinprofils Reif- und Frühgeborener, um den Einfluss des GA zu eruieren und Rückschlüsse auf die intrauterine Reifung zu ziehen. Durch die Generierung eines longitudinalen Proteom-Datenprofils, wurden zusätzlich postnatale Entwicklungsprozesse beurteilt. Diese beiden Zeitachsen sollten in einem nächsten Schritt verglichen werden, um Unterschiede im Reifungsprozess zu analysieren, die sich durch eine Frühgeburtlichkeit und der damit verbundenen frühzeitigen Exposition gegenüber der Umwelt ergeben. Zusammenfassend sollten neue Proteine bzw. Proteincluster/-profile in ihrer Dynamik als Indikator für den Reifungsprozess von FG etabliert werden.

In Kombination mit der umfassenden klinischen Datenanalyse und Phänotypisierung der FG sollte eine Verknüpfung mit möglichen pathologischen Prozessen hergestellt werden und ggf. mögliche prä-, -peri und -postnatale Einflussfaktoren ermittelt werden. Dies sollte ein besseres Verständnis der frühen Entwicklungsbiologie sowie Krankheitspathogenese versprechen.

## **2 Material und Methoden**

Bei der vorliegenden monozentrischen, prospektiv klinischen Kohortenstudie wurde das Proteom von FG und RG anhand von Vollblut analysiert. Die Probenentnahme erfolgte zu vordefinierten Zeitpunkten im Rahmen klinisch notwendiger Blutabnahmen. Ergänzend wurden klinische Daten anhand von Aktenarbeit und eines eigens erstellten Fragebogens erhoben.

### **2.1 Patientenkollektiv**

Die Rekrutierung der Patienten (FG und RG) erfolgte am Perinatalzentrum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München auf der Neugeborenen-Intensivstation und der Allgemeinen Geburtstation zwischen Februar 2017 und Juni 2019. Der Beobachtungszeitraum gliederte sich in drei Phasen. Phase 1 konzentrierte sich auf die Rekrutierung von FG innerhalb eines Zeitraumes von Februar 2017 bis Mai 2018. Die Hauptstudienphase (Phase 2) erstreckte sich von Mai 2018 bis Dezember 2018 und schloss FG und RG in die Studie ein. Aufgrund geringer Fallzahlen erfolgte von Dezember 2018 bis Juni 2019 zusätzlich Phase 3, in der Neugeborenen gemäß unten genannter Einschlusskriterien in die Studie aufgenommen wurden.

Sofern das Studiendesign eingehalten werden konnte, wurden alle FG und RG (GA von 23 bis 42 SSW) mit Geburt und stationärem Aufenthalt während des Beobachtungszeitraums in die Studie aufgenommen (Geburtskohorte).

Der Fokus von Phase 1 lag auf FG mit Einschluss aller Neugeborener mit einem GA < 37 SSW. Phase 3 folgte restringierten Kriterien mit Einschluss der Neugeborenen bei a) GA <30. SSW, b) SGA <10. Perzentile, c) Infektion, d) Asphyxie und e) Reifgeborene mit mütterlichem Diabetes. Ein Ausschluss der Neugeborenen erfolgte bei angeborenen Fehlbildungen des Kindes, familiären Immundefekten, oder einer Infektionserkrankung (HIV-, Hepatitis-B oder C- Infektion) der Mutter.

### **2.2 Einverständniserklärung**

Die schriftliche Einverständniserklärung eines der Erziehungsberechtigten stellte eine Voraussetzung für die Studienteilnahme dar. Zuvor wurden die Eltern bzw. Mütter nach Geburt ihres Kindes ausführlich über die wissenschaftliche Fragestellung, das Procedere der Blutentnahme, Nutzen und Risiken der Studie für das Kind aufgeklärt und Datenschutz, die klinische Datenerhebung sowie Grund und Inhalt des Fragebogens erläutert.

Die Genehmigung der Studie durch die Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München lag zum zeitlichen Beginn der Patientenrekrutierung vor.

## 2.3 Studiendesign

### 2.3.1 Zeitpunkt der Probenentnahme

Die Probenentnahme fand ausschließlich im Rahmen klinisch notwendiger Blutentnahmen statt. Bei FG erfolgte die Blutentnahme an bis zu 4 Zeitpunkten: Geburt (*G*, 1. Lebenstag), Neugeborenen-screening (*NGS*, 36-72h nach Geburt), Neugeborenen-screening bei einem kGA von 32 SSW (*NGS 32+0*) und bei der Entlassung (*E*) aus der Klinik (Abb. 3). In Phase 1 erfolgte die Abnahme nur zu den Zeitpunkten *G* und *NGS*. Gesunden RG wurde routinemäßig nur einmal beim *NGS* Blut entnommen. Zusätzlich wurde im Falle einer Infektion vor und 48h nach der Antibiotika-Gabe sowie im Falle einer Asphyxie an Lebenstag 1 und 2 Blut entnommen. Die Abnahmepunkte wurden nach Möglichkeit ebenfalls den Zeitpunkten *G*, *NGS*, *NGS 32+0* oder *E* zugeordnet.

Bei Verlegung der Neugeborenen in das Dr. von Hauner'sche Kinderspital wurde die Studie fortgeführt.



Abbildung 3: Blutabnahmeschema für Frühgeborene

### 2.3.2 Klinische Daten des Neugeborenen und der Mutter

Insgesamt wurden über 450 klinische, nicht-Proteom-bezogene Daten anhand von Dokumentationen von Ärzten und Klinikpersonal erhoben. Dies umfasste u.a. das Basisdatenblatt mit anthropometrischen Daten des Neugeborenen bei Geburt, den Kreißsaalbericht, den Arztbrief bei Entlassung, im System erfasste Diagnosen, Ergebnisse von Standardlaborabnahmen und Interventionen. Zusätzlich erfolgte die Sammlung klinischer Daten der Mutter anhand des ausführlichen Kreißsaalberichts. Diese beinhalteten neben anthropometrischen Daten und gesundheitlichem Status der Mutter, ebenfalls Informationen zum Schwangerschafts- und Geburtsverlauf.

Die Bestimmung des GA erfolgte durch erfahrene Gynäkologen anhand der letzten Menstruationsblutung der Mutter, sowie anhand des Ersttrimester-Ultraschalls. Dabei wurde das GA in abgeschlossenen Wochen (bzw. abgeschlossenen Tagen) beschrieben, sodass zum Beispiel 210-216 abgeschlossene Tage einem GA von 30 SSW entsprechen.

Asphyxie wurde definiert als neonataler Stress plus einem pH-Wert  $< 7.0$  oder einem Base Excess  $< -16.0$ , Infektion bei klinischen Zeichen einer Sepsis inklusive einer Antibiotikagabe ab 5 Tagen. Die weiteren aufgelisteten Krankheitsbilder sind nach den aktuell geltenden Leitlinien der entsprechenden Fachgesellschaften definiert.

### 2.3.3 Fragebogen

In Phase 2 und 3 wurden Eltern der Studienteilnehmer gebeten, optional einen ausführlichen, eigens erstellten Fragebogen zu beantworten. Es wurde eine ausführliche Schwangerschafts- und gynäkologische Anamnese erhoben, sowie die Inanspruchnahme reproduktiver Maßnahmen und Informationen zu vorherigen Schwangerschaften erfragt. Daten zu ethnischem Hintergrund sowie Angaben zu Lebensstil und Umweltfaktoren, Reisen, Alkohol-, Medikamenten- und Nikotinabusus kurz vor und während der Schwangerschaft wurden erfasst.

Außerhalb der durch die Fragebogen erhobenen Daten erfolgten keine weiteren Erhebungen im Sinne weiterer Studien-Termine oder eines Follow- Ups für die Studienteilnehmer.

## 2.4 Datenschutz

Die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und Datenschutz wurden bei Durchführung der Studie eingehalten. Die erhobenen persönlichen Daten wurden pseudonymisiert ausgewertet, sodass keine Namen, Initialen und Geburtsdaten im Verschlüsselungscode enthalten waren. Die Blutproben wurden in pseudonymisierter Form an das Max-Plank-Institut (MPI) für Biochemie in Martinsried weitergegeben. Der Code der Pseudonymisierung setzte sich bei fortlaufender Nummerierung der Neugeborenen (d.h. keine Mehrfachvergabe der Nummern) aus vier Teilen zusammen: Reif- oder Frühgeborenes (*N* oder *F*), fortlaufende Nummer, Abnahmezeitpunkt (*G*, *S*, *S2*, *E*) und Abnahmeart (*V*=venös, *K*=kapillär, *A*=arteriell) anhand eines Farbcodes (Abb. 4). Eine Entschlüsselung der Daten wird lediglich aus medizinischen oder wissenschaftlichen Gründen vorgenommen.



Abbildung 4: Pseudonymisierung der Blutproben

## 2.5 Untersuchung des Proteoms

### 2.5.1 Probengewinnung und Lagerung

Das Blut (ca. 0,2 ml) wurde entweder kapillär (Fersenblut), venös oder arteriell (mittels kommerziell erhältlicher Butterfließ) abgenommen. Dabei wurde eine Fläche von 12,5 mm Durchmesser auf der Filterkarten (Whatman™ 903 Probeentnahmekarte) von einer Seite mit ca. 80 µl Blut getränkt. Nach Trocknung der Filterkarten für 24 Stunden unter trockenen, zugluft- und sonnengeschützten Bedingungen wurden diese bei -80° Celsius bis zur Auswertung gelagert.

## 2.5.2 Probenprozessierung und massenspektrometrische Auswertung

Die massenspektrometrische Auswertung der Blutproben erfolgte durch das MPI für Biochemie in Martinsried. Die Proben wurden mittels automatisierter Probenaufbereitungspipeline vorbereitet und anhand etablierter Bioinformatik-Tools interpretiert.

### **Proben-Aufbereitung: Protein-Extraktion, Verdauung und in-StageTip Aufreinigung**

Die Trockenblutproben wurden mit einer 14-Gauge Spritze ausgestochen, in eine 96-Well-Platte (Eppendorf TwinTec, low-bind) aliquotiert und 20 µl H<sub>2</sub>O pro Well zugegeben. Die weitere Probenaufbereitung erfolgte gemäß dem Plasma „Proteome Profiling Workflow“ (inStage-Tip Protokoll) (178). Zusammenfassend wurden 20 µl 2x Lyse-Puffer (80mM Chloroacetamid, 20 mM TCEP, 200 mM Tris, 2% Glycocholic acid (w/v), pH 8,0) in die Well-Platte hinzugegeben und die Proben zur Reduktion von Disulfidbrücken, Cystein-Alkylierung und Proteindenaturierung bei 95°C für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Covaris LE200-plus beschallt und durch die Verdauungsenzyme Trypsin und LysC (Verhältnis 1:100, µg Enzym zu µg Probenprotein) bei 37°C für 4h in Peptide verdaut. Der Proteinanteil pro ausgestochenem Filterkartenanteil wurde auf ca. 200 µg bestimmt. Der Verdauung wurde durch die Zugabe von 100 µl Puffer A (1% FA in H<sub>2</sub>O) beendet und 500 ng verdaute Proteine gemäß dem Hersteller-Protokoll auf Evotips (Evosep, Odensee, Denmark) geladen, was gleichzeitig zur Entsalzung der Proben diente.

### **Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) und Massenspektrometrie (MS)**

Die Analyse der Proben erfolgte mittels LC-MS. Dieses bestand aus einem Evosep One Chromatographen-System (Evosep, Odensee, Dänemark), welches an ein Exploris 480 Instrument (Thermo Fisher Scientific) mit High-field asymmetric waveform ion mobility (FAIMS) Schnittstelle (Thermo Fisher Scientific) gekoppelt war und Nano-Elektronenspray (Thermo Fisher Scientific) als Ionenquelle verwendete. Die Datenerfassung erfolgte mittels Phasen-Spektrum-Dekonvolutions-Methode (179). Es wurde eine selbst gepackte 15 cm lange HPLC-Säule (Innendurchmesser (ID): 150 µm; gepackt in eine gezoogene ESI-Spitze mit ReproSil-Pur C18-AQ 1,9 µm beads (Dr. Maisch GmbH)) in Kombination mit dem 44min, 30 SPD-Gradienten des Herstellers (Evosep) verwendet. Die Säulentemperatur wurde mit Hilfe eines im MPI selbst entworfenen Ofen mit Peltier-Element konstant bei 60°C gehalten. Die Parameter wurden in Echtzeit mittels SprayOC Software überwacht (180).

Um MS-Daten zu erhalten, wurde für die Patientenproben ein Daten-unabhängiger Aquisitions (DIA)-Scanmodus verwendet, wohingegen fraktionierte Proben von Probenpools mit einem top12 Daten-abhängigem Aquisitions (DDA)-Scanmodus generiert wurden. Alle Proben wurden mittels des FAIMS-Geräts, welches an den Eingang des Massenspektrometers gekoppelt war, analysiert. Bei einer Ausgleichsspannung von -45 V wurden beide Aquisitionsschemata mit derselben Flüssigkeits-Chromatographen-Methode kombiniert. Das Massenspektrometer wurde mit der Xcalibur-Software betrieben

(Thermo Fisher). Die DDA-Scan-Einstellungen bei vollem MS-Level beinhalteten ein automatisches „Gain Control Target Set“ bei 300% im 300-1.400 m/z Umfang mit einer maximalen Injektionszeit von 25 ms und einer Auflösung von 60.000 bei einer m/z von 200. Bei MS/MS-Level lag der automatische Gain-Control-Target-Wert bei 200% mit einer maximalen Injektionszeit von 22 ms und einer Auflösung von 15.000 bei m/z von 200. Ausschließlich bei MS/MS-Ereignissen wurden Ionenvorläufer mit 2-6 Ladungen, die nicht Bestandteil der 30s dynamischen Ausschlussliste waren, in einem 1,3 m/z Fenster isoliert. Die Fragmentierung erfolgte mittels „higher-energy C-trap dissociation“ (HCD) bei 30%. Der DIA-Scanmodus wurde mit einem vollen MS1 Scan, gefolgt von 60 MS/MS Fenstern durchgeführt. Das volle MS-Setting beinhaltete ein automatisches „Gain-Control-Target Set“ von 300% in einem 300-1.650 m/z Bereich mit einer maximalen Injektionszeit von 50 ms und einer Auflösung von 60.000 bei m/z von 200. Die DIA Vorläufer-Fenster reichten von 349,5 m/z (untere Grenze des ersten Fensters) bis 1650,5 m/z (obere Grenze des 60sten Fensters). MS/MS-Einstellungen beinhalteten ein automatisches „Gain-Control-Target Set“ von 1000% für die Vorläufer-Fenster mit einer Xcalibur-automatisierten maximalen Injektionszeit und einer Auflösung von 15.000 bei m/z von 200.

### **2.5.3 Qualitätskontrolle**

Für die Probensammlung, -lagerung und -aufbereitung, die Erhebung der klinischen Daten der Studienteilnehmer, sowie Datenerfassung des Proteoms wurden extra entwickelte Standard Operating Procedures (SOPs) etabliert.

Die massenspektrometrische Probenaufbereitung wurde anhand von Analyseparametern wie Methionin-Oxidierung, Acetylierungsraten, Identifikationsratio und missed cleavage rate evaluiert. Das Massenspektrometer wurde wöchentlich evaluiert und kalibriert.

### **2.5.4 Work-Flow-Validation**

Die Reproduzierbarkeit des Arbeitsablaufs wurde durch das Labor anhand eines Vergleichs von Proben verschiedener Individuen, sowie 5 Replikate desselben Blutflecks sichergestellt. Die Reproduzierbarkeit der technischen Replikate war mit einem Pearson-Korrelationskoeffizient von 0,97 sehr hoch, während die Korrelation zwischen den Individuen mit einem Pearson-Korrelationskoeffizienten von nur 0,85 um einiges geringer war. Dies impliziert eine weitaus höhere biologische im Vergleich zur technischen Variation, was wiederum ermöglicht, biologisch relevante Informationen im Blutproteom zu finden.

Zur Vermeidung potenzieller Fehler der Probengewinnung, -sammlung, -und lagerung wurden verschiedene Experimente zur Identifikation solcher entworfen. Zum einen zeigte sich eine systematische Degradation bestimmter Proteine in Trockenblutproben bei Raumtemperatur. Um dies zu verhindern, wurden alle Trockenblutproben bei -80°C gelagert. Vorläufig zur Studie wurden Nabelschnurblut und

Fersenblut verglichen. Aufgrund der geringen Unterschiede wurde die kapilläre Methode zur Proben-sammlung zugelassen. Dies erleichterte die Probengewinnung und ermöglichte die Optimierung der Probenhandhabung und die Reduktion einer systematischen Verzerrung der Studie.

## **2.6 Datenauswertung**

### **2.6.1 Statistische Analyse der klinischen Daten**

Die deskriptive statistische Analyse erfolgte mit Microsoft® Excel Version 2111 sowie GraphPad© Prism Version 9.2.0. Baseline-Charakteristika (Mittelwert und Standardabweichung für numerische Daten bzw. Anzahl und Prozent für kategorische Daten) wurden in Excel berechnet. Die weitere statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad© Prism. Vor jeder statistischen Analyse wurde die Normalverteilung mittels D'Agostino-Pearson Normalverteilung überprüft. Aufgrund kleiner Kohortengrößen konnte diese z.T. nicht überprüft werden und wurde dem entsprechend nicht angenommen. Es erfolgte der Vergleich von Untergruppen, die anhand des GA gebildet wurden. Für kategorische Daten wurde der Fisher's Exact Test herangezogen. Der Vergleich von numerischen Daten zweier Gruppen erfolgte mittels T-Test bzw. Mann-Whitney-U-Test.

### **2.6.2 Analyse der massenspektrometrischen Rohdaten**

Mittels MaxQuant-Software (Version 1.6.1.13) (181) wurde aus den MS-Daten des fraktionierten Proteom-Pools eine DDA-Bibliothek generiert. Anhand dieser Spektrum-Bibliothek wurden die MS-Daten der Patientenproben zur finalen Proteinidentifikation und Quantifizierung mit der Software Spectronaut (Version 14.9.201124.47784 (Biognosys AG)) durchsucht und verglichen. Jede Suche wurde gegen die menschliche UniProt-Datenbank als Referenz-Proteom für canonical und Isoform-Sequenzen (Download im März 2018, 93.786 Einträge) durchgeführt. Die Suche beinhaltete Cystein-Carbamidomethylation als festgesetzte Modifikation, sowie N-terminale Acetylierung, Oxidierung an Methionin und Deamidierung von Asparagin oder Glutamin als variable Modifikationen. Für andere Parameter wurden Standardeinstellungen verwendet. Die Enzymspezifität wurde mit Trypsin mit einem Maximum von 2 „missed cleavages“ und einer Peptidlänge von 7-52 Aminosäuren festgesetzt.

### **2.6.3 Bioinformatische Analyse der Proteom-Daten**

Die bioinformatische Analyse erfolgte mittels Perseus Version 1.6.5.0 (182). Dabei handelt es sich um eine frei zugängliche, vom MPI entwickelte Software zur Interpretation von Proteinquantifizierungen, Interaktionen und posttranslationalen Modifikationen (182, 183). Signifikant veränderte Proteine zwischen den FG-Gruppen und der Kontrollgruppe der RG (Querschnittsdaten) bzw. zwischen den Abnahmezeitpunkten NGS, NGS 32+0, E und der Basisabnahme G (longitudinale Daten) wurden mittels T-Test bei einer permutationsbasierten Falscherkennungsrate (FDR) von 0,05 ermittelt. Für signifikante

Treffer wurden der P-Wert und der minimale Fold Change (Mittlere Differenz) berechnet. Fold Changes wurden für die Querschnittsdaten als FG-Untergruppe/RG-1 für protein label-free (LFQ)-Intensitäten bzw. für die longitudinalen Daten als Zeitpunkt NGS oder NGS 32+0 oder E/ G-1 angegeben. Um biologische Prozesse aufzudecken, wurden die Proteine mit Gene Ontology biological process (GOBP), molekularer Funktion (GOMF), zellulärem Kompartiment (GOCC) und Uni-Prot-KB-Keywords annotiert und nach „ribosomal“, „immunoglobulin“, „complement“, „coagulation“, „apolipoprotein“, und „hemoglobin“ durchsucht. Zur Darstellung der Ergebnisse in Form einer Heat Map erfolgte ein Z-Scoring der Intensitäten und anschließend eine hierarchische Clusteranalyse anhand der errechneten Z-gescorten Mediane.

Der Vergleich einzelner Proteine zwischen den Gestationsaltern bzw. Zeitpunkten erfolgte mittels T-Test in GraphPad© Prism Version 9.2.0.

Zur Datenanalyse wurden die 4 Hauptabnahmezeitpunkte (G, NGS, NGS 32+0 und E) mit einer Mindestanzahl von 400 Proteinen pro Probe herangezogen. Zusätzlich wurden die Daten auf 70 Prozent Vollständigkeit in mindestens einer vordefinierten Neugeborenen-Untergruppe bzw. pro Zeitpunkt gefiltert. Anhand des resultierenden Datensets erfolgte die finale statistische Auswertung.

### **3 Ergebnisse**

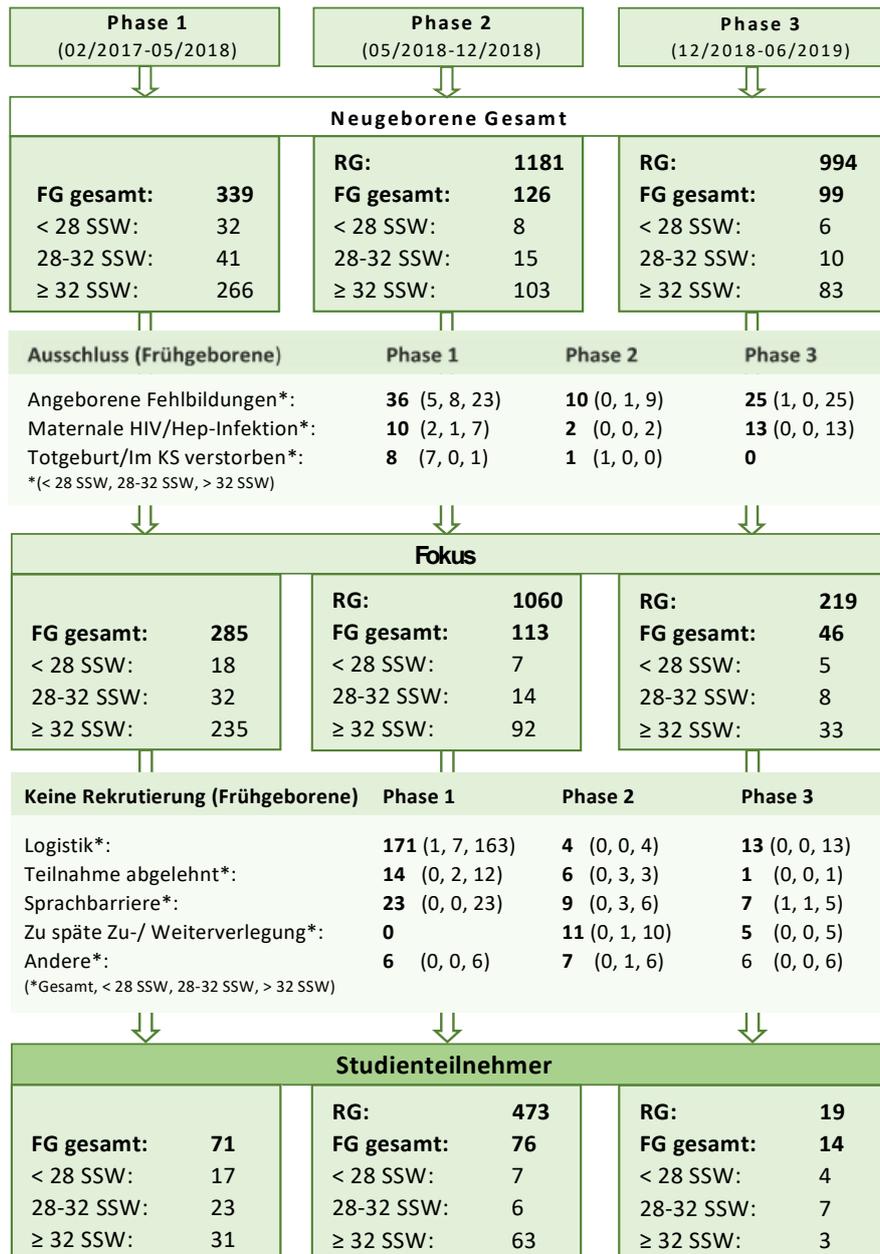
#### **3.1 Kohortenübersicht**

Die Rekrutierung der Studienteilnehmer erfolgte in 3 Phasen anhand der genannten Ein- und Ausschlusskriterien am Perinatalzentrum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München in einem Zeitraum von Februar 2017 bis Juni 2019 (Abb. 5). Insgesamt wurden 161 FG und 492 RG in die Studie eingeschlossen. Die FG wurden in die von der WHO definierten Untergruppen unterteilt (28 ExtFG, 36 SehrFG und 97 SpätFG).

In Phase 1 wurden 85 Familien von 285 geeigneten FG um eine Studienteilnahme gebeten (30%), wovon 71 der Teilnahme zustimmten (84% Einwilligung). Für Phase 2 konnten 113 geeignete FG identifiziert werden. 82 der Eltern (73%) wurden um eine Teilnahme gebeten, welcher 76 zustimmten (93% Einwilligung). In Phase 3 wurden 15 von 46 Familien der geeigneten FG gefragt, Teil der Studie zu sein (33%). Davon willigten die Eltern von 14 FG ein (93% Einwilligung). Die Rekrutierung der RG erfolgte vor allem in Phase 2. Von 1060 geeigneten Patienten, wurden 537 um eine Studienteilnahme gebeten (51%), wovon wiederum 473 zustimmten (83%). In Phase 3 wurden 219 RG anhand der für diese Phase strikteren Einschlusskriterien als geeignet identifiziert. 23 (11%) wurden um eine Teilnahme gebeten, 19 (83%) davon wiederum willigten ein (Ergänzende Tab. 1).

Für die fehlende Aufnahme geeigneter FG in die Studie konnten vor allem 2 Gründe identifiziert werden. Zum einen sind logistische und organisatorische Hindernisse durch die Abwesenheit der Eltern (N=88, 66%), zum anderen die Sprachbarriere im Sinne fehlender Deutsch- und Englischkenntnisse (N=39, 21%) zu nennen.

Der Erhebung der klinischen Daten anhand der Dokumentation im Rahmen des stationären Aufenthalts fand ausnahmslos für alle Studienteilnehmern statt (100%).



Altersgruppen	RG	FG	ExtFG	SehrFG	SpätFG
	≥ 37 SSW	< 37 SSW			
<b>Neugeborene</b>	492	161	28	36	97
<b>Mütter</b>	484	128	24	27	77
<b>Fragebogen</b>	465	66	6	9	51
<b>Blutproben</b>	566	289	58	75	156

Abbildung 5: Flowchart-Patientenrekrutierung

Für eine genaue Übersicht über die Sammlung von Blutproben in Abhängigkeit der Rekrutierungsphasen siehe ergänzende Tabelle 3.

## 3.2 Klinische Daten

### 3.2.1 Basisdaten der Kinder

Insgesamt wurden 161 FG in die Studie eingeschlossen. Das durchschnittliche GA der FG betrug 32 SSW (SD 3,9) mit einer Spanne von 13 Wochen (Min. 23 SSW, Max. 36 SSW). 492 rekrutierte RG (nach abgeschlossener 37. SSW) dienen als Kontrollgruppe. Die Charakteristika der Studienteilnehmer sind in Tabelle 1 sowie ergänzende Tabelle 4a und 4b dargestellt.

	Reifgeborene	Frühgeborene	ExtFG	SehrFG	SpätFG
Gestationsalter	≥ 37 SSW	< 37 SSW	< 28 SSW	28-32 SSW	≥ 32 SSW
Anzahl	492	161	28	36	97
<b>GA (Wochen), M (SD)</b>	39,4 (1,2)	32 (3,9)	25 (1,3)	29 (1,2)	34 (1,4)
GA (Tage), M (SD)	279 (8)	224 (27)	178 (9)	208 (9)	243 (10)
<b>Geschlecht weiblich, N (%)</b>	229 (47)	62 (39)	12 (43)	8 (22)	42 (43)
<b>Geburtsgewicht (g), M (SD)</b>	3421 (471)	1767 (747)	725 (174)	1300 (315)	2241 (511)
Perzentile GG, M (SD)	47 (27)	44 (25)	45 (31,5)	45 (22)	43 (25)
<b>Körperlänge (cm), M (SD)</b>	52 (3)	41 (6)	32 (3)	39 (3)	45 (4)
Perzentile GL, M (SD)	60 (28)	52 (30)	53 (33)	45 (28)	54 (30)
<b>Kopfumfang (cm), M (SD)</b>	35 (1)	29 (4)	23 (2)	28 (2)	32 (2)
Perzentile KU, M (SD)	53 (27)	58 (26)	54 (27)	59 (28)	58 (26)
<b>APGAR Score 1, M (SD)</b>	8,9 (2)	7,3 (2)	5,6 (2)	6,7 (2)	8 (2)
APGAR Score 5, M (SD)	9,7 (1)	8,7 (2)	7,6 (2)	8,4 (2)	9,1 (1)
APGAR Score 10, M (SD)	9,8 (1)	9,3 (1)	8,6 (2)	9,2 (1)	9,6 (1)
<b>Mehrlingsschwangerschaft, N (%)</b>	16 (3)	64 (40)	8 (29)	17 (47)	39 (40)
Sectio, N (%)	115 (23)	100 (62)	22 (79)	27 (75)	51 (53)

**Tabelle 1: Anthropometrische Daten der Neugeborenen**

Die Studienpopulation der FG zeigte einen signifikant geringeren Anteil an weiblichen Patienten (39%) im Vergleich zu RG (46%,  $p \leq 0,0001$ ). In der Gruppe der FG (40%) fielen signifikant häufiger Mehrlingsschwangerschaften im Vergleich zu der Gruppe der RG (3%) auf ( $p < 0,0001$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen den FG-Gruppen konnte nicht gezeigt werden. Ein großer Anteil der FG wurde mittels Kaiserschnittes (Sectio) entbunden (62%). Im Gegensatz dazu kamen RG signifikant häufiger mittels Spontangeburt (48%) zur Welt ( $p < 0,0001$ ).

In Abhängigkeit vom GA zeigten sich postnatal typische Erkrankungen von FG bzw. RG (Tab. 2, ergänzend Tab. 5a und b im Anhang). Die Morbidität bzw. Komplikationsrate stieg mit abnehmendem GA an.

	Reifgeborene	Frühgeborene	ExtFG	SehrFG	SpätFG
Gestationsalter	≥ 37 SSW	< 37 SSW	< 28 SSW	28-32 SSW	≥ 32 SSW
Anzahl	492	161	28	36	97
<b>Asphyxie, N (%)</b>	9 (2)	2 (1,2)	1 (4)	0 (0)	1 (1)
<b>Hämatologisch, N (%)</b>	16 (3)	46 (29)	22 (79)	10 (28)	14 (14)
Thrombozytopenie, N (%)	8 (1,6)	24 (15)	11 (39)	5 (14)	8 (8)
Anämie, N (%)	3 (0,6)	28 (17)	22 (79)	6 (17)	0 (0)
Polyglobulie, N (%)	5 (1,0)	6 (4)	0 (0)	1 (3)	5 (5)
Gerinnungsstörung, N (%)	1 (0,2)	8 (5)	4 (4)	3 (8)	1 (1)
<b>Infektion, N (%)</b>	37 (8)	33 (21)	21 (75)	5 (14)	7 (7)
Vermutete Infektion, N (%)	41 (8)	82 (51)	7 (25)	29 (81)	46 (47)
<b>Kardiovaskulär, N (%)</b>	26 (5)	45 (28)	23 (82)	13 (36)	9 (9)
Hypo-/ Hypertension, N (%)	7 (1,4)	16 (10)	7 (25)	5 (14)	4 (4)
ASD oder PFO, N (%)	6 (1,2)	17 (11)	7 (25)	7 (19)	3 (3)
VSD, N (%)	3 (0,6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>PDA, N (%)</b>	4 (0,8)	20 (12)	16 (57)	4 (11)	0 (0)
<b>Neurologisch, N (%)</b>	12 (2,4)	37 (23)	12 (43)	14 (39)	11 (11)
ICH jeden Grades, N (%)	0 (0)	16 (10)	9 (32)	5 (14)	2 (2)
PVE jeden Grades, N (%)	2 (0,4)	11 (7)	7 (25)	2 (6)	2 (2)
HIE, N (%)	6 (1,2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Respiratorisch, N (%)</b>	45 (9)	109 (68)	28 (100)	36 (100)	45 (46)
RDS, N (%)	15 (3)	85 (53)	28 (100)	32 (89)	25 (26)
Apnoe-Bradykardie-Syndrom, N (%)	1 (0,2)	46 (29)	18 (64)	21 (58)	7 (7)
BPD jeden Grades, N (%)	0 (0)	16 (10)	13 (46)	3 (8)	0 (0)
<b>ROP jeden Gades, N (%)</b>	0 (0)	18 (11)	15 (54)	3 (8)	0 (0)

**Tabelle 2: Erkrankungen der Neugeborenen**

(PDA= Persistierender Ductus arteriosus botalli, ASD= Atriumseptumdefekt, PFO= Persistierendes Foran ovale, VSD= Ventrikelseptumdefekt, RDS= Respiratory Distress-Syndrom, BPD= Bronchopulmonale Dysplasie, ICH= Intrazerebrale Hämorrhagie, PVE= Periventrikuläre Echogenitätserhöhung, HIE= Hypoxisch-ischämische Encephalopathie, ROP= Retinopathia praematurorum).

*Hämatologische Erkrankungen* (darunter Anämie, Thrombozytopenie, Polyglobulie und Gerinnungsstörungen) zeigten sich signifikant vermehrt bei FG (29%) im Vergleich zu RG (3%,  $p \leq 0,0001$ ).

Die Prävalenz an *Infektionen* betrug bei FG 21% und bei RG 8%. Der Anteil an Infektionen war bei ExtFG mit 75% im Vergleich zu den beiden anderen FG-Gruppen (14% SehrFG, 7% SpätFG) signifikant erhöht. *Kardiovaskuläre Erkrankungen* fanden sich mit 82% vor allem bei ExtFG und traten im Vergleich bei nur 36% der SehrFG und 9% der SpätFG, sowie nur 5% der RG auf. Die SpätFG unterschieden sich dabei nicht signifikant von den RG. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich dagegen zwischen den FG-

Gruppen. Ein PDA wurde bei 12% aller FG diagnostiziert und war mit 57% insbesondere bei ExtFG zu beobachten.

Im Bereich der *neurologischen Erkrankungen* ist zu vermerken, dass kein Neugeborenes eine Periventriculäre Leukomalazie (PVL) entwickelte. Allerdings zeigten 43% der ExtFG und 39% der SehrFG Komplikationen wie eine intrazerebrale Blutung jeden Grades (ICH I-III) (32% bzw. 14%) oder eine periventriculäre Echogenitätserhöhung (PVE) in der Schädel-Sonographie (25% bzw. 6%). In der Gruppe der SpätFG konnten bei 11% neurologische Komplikationen festgestellt werden, bei RG in nur 2% der Fälle.

*Respiratorische Erkrankungen* stellten mit insgesamt 68% die häufigsten postnatalen Komplikationen dar. Alle FG mit GA <32 Wochen (100%) und ein immer noch recht hoher Anteil von 46% bei einem GA  $\geq$  32 Wochen (SpätFG) war betroffen. Insgesamt wurden bei 53% der FG ein RDS, bei 29% eine Apnoe-Bradykardie-Syndrom und bei 10% eine BPD diagnostiziert. Die FG-Gruppen unterschieden sich dabei weitgehendst signifikant untereinander. Bei RG manifestierte sich in nur 9% der Fälle eine respiratorische Erkrankung.

Eine genaue Aufstellung über die Interventionspflichtigkeit und jeweilige Maßnahmen ist in der ergänzenden Tabelle 6 im Anhang zu finden. In Übereinstimmung mit dem hohen Anteil an Infektionen bzw. vermuteten Infektionen vor allem bei ExtFG und SehrFG (Geburt vor 32 SSW) erhielten 97% eine (z.T. prophylaktische) Antibiotika-Therapie. Bei SpätFG waren es im Vergleich nur 55%, bei RG 16%. FG mit einem GA <32 Wochen benötigten zu 98% eine Beatmungsunterstützung in Form einer nicht-invasiven Beatmung (IPAP, CPAP, HFNC oder einfache Sauerstoffmaske). 50% der ExtFG war auf eine invasive Beatmung angewiesen. Im Vergleich dazu benötigten nur 45% der FG >32 Wochen (SpätFG) und 7% der RG eine Beatmungsunterstützung. Zusätzlich erhielten 96% der ExtFG eine Surfactant-Therapie, die bei 61% der SehrFG und nur 3% der SpätFG nötig war.

### **3.2.2 Basisdaten der Eltern**

Die anthropometrischen Daten der Eltern sind in Tabelle 3 und ergänzende Tabelle 7 wiedergegeben. Das Durchschnittsalter der Mütter betrug  $34,6 \pm 5,4$  Jahre für FG und  $34,0 \pm 4,6$  Jahre für RG. In allen FG-Gruppen zeigte sich ein signifikant höherer Anteil an Müttern  $\geq$  35 Jahren mit insgesamt 56% bei FG, im Vergleich zu 45% bei RG ( $p \leq 0,05$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen den FG-Gruppen zeigte sich nicht.

Der BMI vor der Schwangerschaft lag bei den Müttern von FG im Durchschnitt bei  $23,1 \pm 4,6$  kg/m<sup>2</sup>, bei den Vätern bei  $25,2 \pm 3,0$  kg/m<sup>2</sup>. Bei beiden Geschlechtern zeigten sich nur geringe Unterschiede in den FG-Gruppen oder im Vergleich zu RG (Frauen  $22,4 \pm 3,3$  kg/m<sup>2</sup>, Männer  $25,1 \pm 3,2$  kg/m<sup>2</sup>). Der BMI, der anhand des Gewichts bei Erstuntersuchung (EU) der Mütter berechnet wurde ( $23,4 \pm 4,8$  kg/m<sup>2</sup>),

wich nur leicht vom BMI, dessen Berechnung anhand des Gewichts vor der Schwangerschaft erfolgte ( $23,1 \pm 4,6 \text{ kg/m}^2$ ), ab. Aufgrund der Vollständigkeit der Daten ist die Zuordnung der Eltern in die Adipositas-Klassifikation hier anhand des BMIs bei Erstuntersuchung dargestellt. 9% der Mütter Frühgeborener sowie 4% der Väter konnten als Adipositas klassifiziert werden. Dabei zeigte sich ein leicht signifikanter Unterschied im Auftreten von Adipositas sowohl anhand des Gewichts vor der Schwangerschaft ( $p \leq 0,05$ ) als auch bei Erstuntersuchung ( $p \leq 0,01$ ) zwischen den Müttern von RG und FG. Ein signifikanter Unterschied zwischen den FG-Gruppen zeigte sich nicht.

	Reifgeborene	Frühgeborene	ExtFG	SehrFG	SpätFG
Gestationsalter	$\geq 37$ SSW	$< 37$ SSW	$< 28$ SSW	28-32 SSW	$\geq 32$ SSW
Anzahl der Mütter	484	128	24	27	77
*Fragebogen	461	66	6	9	51
<b>Alter (Jahre) Mutter, M (SD)</b>	34 (4,5)	34,6 (5,4)	35 (6,1)	34,9 (5,5)	34,4 (5,3)
<35 Jahre, N (%)	266 (55)	57 (45)	11 (46)	13 (48)	33 (43)
<b>*Vater, M (SD)</b>	36 (5,8)	37,3 (5,9)	43 (6,1)	37,3 (4,8)	36,6 (5,8)
Keine Angabe	23 (5)	62 (48)	18 (75)	18 (67)	26 (43)
<b>*BMI (kg/m<sup>2</sup>) Mutter vor SS, M (SD)</b>	22,4 (3,3)	23,1 (4,6)	24,5 (4,4)	24,2 (4,2)	22,8 (4,7)
Keine Angabe, N (%)	26 (5,4)	70 (55)	21 (88)	19 (70)	30 (39)
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>) Mutter bei EU, M (SD)</b>	22,8 (3,6)	23,4 (4,8)	24,7 (6,4)	23,5 (3,4)	23,0 (4,6)
Keine Angabe, N (%)	10 (2)	9 (7)	2 (8)	2 (7)	5 (6)
<b>*Vater M (SD)</b>	25,1 (3,2)	25,2 (3,0)	24,1 (1,2)	25,7 (2,9)	25,6 (3,2)
Keine Angabe, N (%)	34 (7)	64 (50)	19 (79)	18 (67)	27 (35)
<b>Adipositas-Score Mutter anhand BMI bei EU</b>					
Normal, N (%)	358 (74) (76)	82 (64) (69)	14 (58) (64)	18 (67) (72)	50 (65) (69)
Prä-Adipositas, N (%)	75 (15) (16)	20 (16) (17)	4 (17) (18)	5 (19) (20)	11 (14) (15)
Adipositas, N (%)	21 (4) (4)	11 (9) (9)	4 (17) (18)	1 (4) (4)	6 (8) (8)
Untergewicht, N (%)	20 (4) (4)	6 (5) (5)	0 (0) (0)	1 (4) (4)	5 (6) (7)
Keine Angabe, N (%)	10 (2)	9 (7)	2 (8)	2 (7)	5 (6)
<b>*Vater</b>					
Normal, N (%)	246 (51) (55)	34 (27) (53)	4 (17) (80)	5 (19) (56)	25 (32) (50)
Präadipositas, N (%)	171 (35) (38)	25 (20) (39)	1 (4) (20)	4 (15) (44)	20 (26) (40)
Adipositas, N (%)	32 (7) (7)	5 (4) (8)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	5 (7) (10)
Untergewicht, N (%)	1 (0,2) (0,2)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)	0 (0) (0)
Keine Angabe, N (%)	34 (7)	64 (50)	19 (79)	18 (67)	27 (35)

**Tabelle 3: Basisdaten der Eltern**

Die Berechnung des Prozentanteils des Adipositas-Scores sowohl der Mutter als auch des Vaters erfolgte einerseits anhand der Gesamtzahl der Mütter bzw. Väter (1. Prozentzahl) bzw. anhand der bekannten Daten (2. Prozentzahl).

### 3.2.3 Schwangerschaft

Eine hypertensive Schwangerschaftserkrankung (Präeklampsie, Eklampsie, und HELLP-Syndrom) konnte bei 16% der FG als Risikofaktor für eine Frühgeburtlichkeit diagnostiziert werden (Vergleich RG 0,6%). Als Ursache der Frühgeburtlichkeit konnte des Weiteren bei 45% der Mütter vorzeitige Wehen, bei 11% eine Isthmozervikale Insuffizienz (bei RG jeweils im 1% Bereich) und bei 47% ein vorzeitiger Blasensprung identifiziert werden. Eine Blutung während der Schwangerschaft hatte sich bei 8% der FG, eine Plazentadysfunktion bei 11% gezeigt. Die Anzahl an vorherigen Frühgeburten war in der Gruppe der FG (9%) im Vergleich zu RG (3%) erhöht. Reproduktionsmedizinische Maßnahmen fanden bei 19% der FG Anwendung, wobei sich kein signifikanter Unterschied zwischen den FG-Gruppen zeigte. Bei den RG war es ein kleinerer Anteil mit 9%. Eine detaillierte Aufstellung ist in Tabelle 4 und ergänzende Tabelle 11 zu finden.

	Reifgeborene	Frühgeborene	ExtFG	SehrFG	SpätFG
Gestationsalter	≥ 37 SSW	< 37 SSW	< 28 SSW	28-32 SSW	≥ 32 SSW
Anzahl Neugeborene	492	161	28	36	97
Anzahl der Mütter	484	128	24	27	77
*Fragebogen	461	66	6	9	51
<b>Hypertensive SS-Erkrankung, N (%)</b>	<b>3 (0,6)</b>	<b>21 (16)</b>	<b>4 (17)</b>	<b>8 (30)</b>	<b>9 (12)</b>
Präeklampsie, N (%)	2 (0,4)	15 (9)	2 (7)	5 (14)	8 (8)
Eklampsie, N (%)	0 (0)	1 (0,6)	0 (0)	1 (3)	0 (0)
HELLP, N (%)	1 (0,2)	4 (3)	1 (4)	2 (6)	1 (1)
Präeklampsie und HELLP, N (%)	0 (0)	2 (1,2)	1 (4)	1 (3)	0 (0)
Keine Angabe, N (%)	0 (0)	3 (2)	0 (0)	2 (6)	1 (1)
Plazentadysfunktion, N (%)	15 (3)	10 (6)	3 (11)	2 (6)	5 (5)
<b>Vorherige Frühgeburt, N (%)</b>	<b>14 (3)</b>	<b>15 (9)</b>	<b>3 (11)</b>	<b>1 (3)</b>	<b>11 (11)</b>
<b>(*) Reproduktionsmedizin, N (%)</b>	<b>42 (9)</b>	<b>31 (19)</b>	<b>5 (18)</b>	<b>9 (25)</b>	<b>20 (21)</b>
Hormonell, N (%)	11 (2)	7 (4)	1 (4)	1 (3)	5 (5)
Insemination, N (%)	1 (0,2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)
IVF, N (%)	9 (2)	10 (6)	1 (4)	2 (6)	8 (8)
ICSI, N (%)	19 (4)	7 (4)	4 (14)	3 (8)	2 (2)
Eizellspende, N (%)	1 (0,2)	7 (4)	0 (0)	3 (8)	4 (4)
Keine Bezeichnung, N (%)	1 (0,2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

**Tabelle 4: Schwangerschaft** (IVF= In-vitro-Fertilisation, ICSI= Intrazytoplasmatische Spermieninjektion)

### 3.3 Proteom-Daten

#### 3.3.1 Übersicht der gewonnenen Blutproben

Eine genaue Aufstellung der abgenommenen Filterkarten ist in Tab. 5 wiedergegeben.

Blutproben N	Reifgeborene	Frühgeborene	ExtFG	SehrFG	SpätFG
<b>N Neugeborene</b>	492	161	28	36	97
<b>Geburt (G), N</b>	<b>52</b>	<b>130</b>	<b>26</b>	<b>35</b>	<b>69</b>
Geburt (G2), N	5	5	2	3	0
Geburt (G3), N	0	1	1	0	0
S05, N	2	0	0	0	0
<b>NGS (36-72h), N</b>	<b>484</b>	<b>95</b>	<b>7</b>	<b>19</b>	<b>69</b>
S15, N	0	5	4	0	1
<b>NGS 32+0 (32+0SSW), N</b>	<b>0</b>	<b>19</b>	<b>8</b>	<b>11</b>	<b>0</b>
S25, N	2	1	0	1	0
<b>Entlassung (E), N</b>	<b>18</b>	<b>29</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>16</b>
E2, N	2	2	1	0	1

**Tabelle 5: Übersicht der abgenommenen Filterkarten**

(G=Abnahme innerhalb 24h nach Geburt, G2 und G3= Zusätzliche Abnahme innerhalb 32h nach Geburt, NGS= Neugeborenenenscreening, NGS 32+0= Neugeborenenenscreening bei korrigiertem Gestationsalter von 32+0 SSW, S05= Zwischenabnahme zwischen G und NGS, S15= Zwischenabnahme zwischen NGS und NGS32+0 bei Neugeborenen <32. SSW, S25= Zwischenabnahme (<72h) bei Neugeborenen >32 SSW, Entlassung (E)= Abnahme bei Entlassung (>72h), E2= zusätzliche Abnahme bei Entlassung)

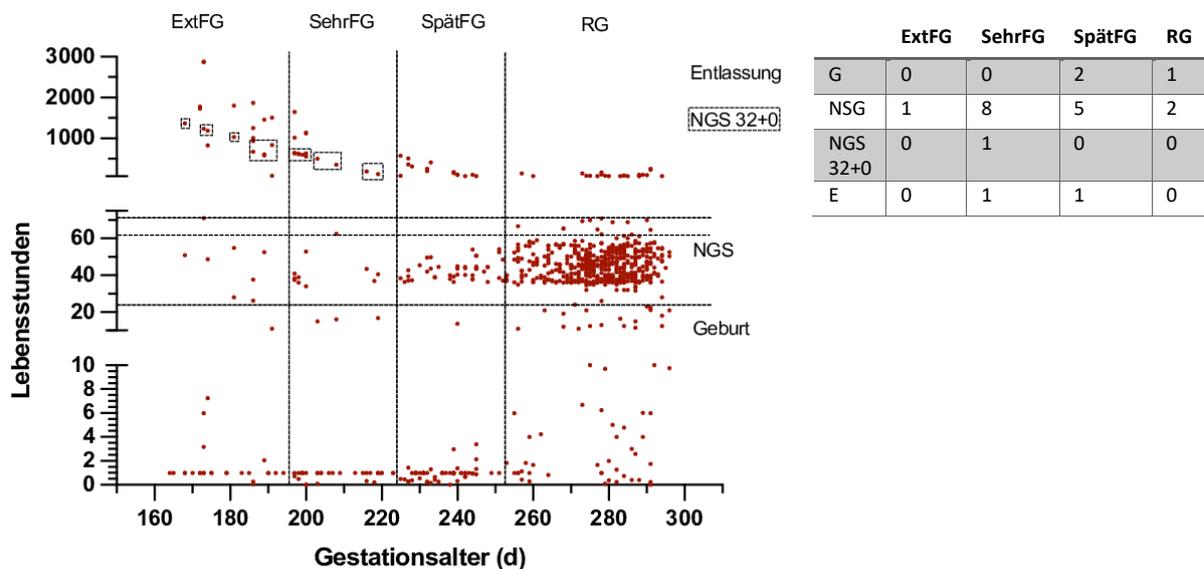
Ein longitudinaler Verlauf wurde als mindestens 2 Blutentnahmen zu den Hauptabnahmezeitpunkten G, NGS, NGS32+0 und E definiert und konnte für insgesamt 69 FG (8 ExtFG, 20 SehrFG und 41 SpätFG) bestimmt werden (Tab. 6).

	Frühgeborene	ExtFG	SehrFG	SpätFG
<b>Longitudinaler Verlauf</b>	69	8	20	41
4 Zeitpunkte, N (%)	9 (13)	4 (50)	5 (25)	-
3 Zeitpunkte, N (%)	20 (29)	3 (37.5)	4 (20)	13 (32)
2 Zeitpunkte, N (%)	40 (58)	1 (12.5)	11 (55)	28 (68)

**Tabelle 6: Longitudinale Abnahme**

Die Zeit der Blutentnahme für die ersten beiden Zeitpunkte G und NGS erfolgte relativ konstant nach 4±6 Stunden (2±4 bei FG und 8±8 bei RG) bzw. 46±8 Stunden (44±7 bei FG und 46±8 bei RG). Das NGS 32+0 bei einem kGA von 32+0 SSW wurde nach durchschnittlich 30±16 Tagen abgenommen. Die Ab-

nahme zum Zeitpunkt E dagegen erfolgte sehr variabel nach  $22 \pm 29$  Tagen (durchschnittlich  $4 \pm 2$  Tage für RG bis  $72 \pm 20$  für ExtFG) (Abb. 6 und ergänzende Tabelle 12).



**Abbildung 6: Zeitliche Übersicht der Blutprobenentnahme**

**Tabelle 7: Missing Data der Entnahmezeitpunkte**

Anzahl der in Abb. 2 nicht dargestellten Blutentnahmen aufgrund fehlender genauer Zeitangaben.

Die Blutentnahme erfolgte bei 48% kapillär (Fersenblut), bei 38% venös und bei 2% arteriell. Bei 12% war das Abnahmeverfahren nicht mehr rekonstruierbar. Insgesamt war bei FG vor allem die venöse (45%), bei RG die kapilläre Abnahme (48%) dominant.

In den folgenden Analysen wurden nur die 4 Hauptabnahmezeitpunkte (G, NGS, NGS 32+0, E) herangezogen.

### 3.3.2 Statistische Vorgehensweise in der Analyse der Entwicklung Frühgeborener

Die Beurteilung des physiologischen Entwicklungsprozesses und Reifung der FG auf Proteinebene erfolgte in 4 Schritten (Abb. 7).

(1) Zuerst wurde der Einfluss des GA bei Geburt auf das Proteomprofil von FG untersucht (1. Zeitdimension). Dazu wurden die FG-Gruppen (ExtFG, SehrFG, SpätFG) jeweils mit der Kohorte der RG verglichen. (2) In einem zweiten Schritt wurde die postnatale Reifung anhand des longitudinalen Abnahmeschemas betrachtet (2. Zeitdimension). (3) Schließlich erfolgte in einem dritten Schritt der Vergleich der beiden Zeitdimensionen (GA und postnatale Reifung) anhand des Proteinverlaufs gemeinsam signifikant veränderter Proteine aus Schritt 1 und 2. (4) Um die extrauterine „Nachreifung“ und mögliche Einflussfaktoren auf das Proteomprofil beurteilen zu können, wurden FG bei einem kGA von 32+0 SSW mit FG, die mit 32 bzw. 33 SSW geboren wurden, verglichen.

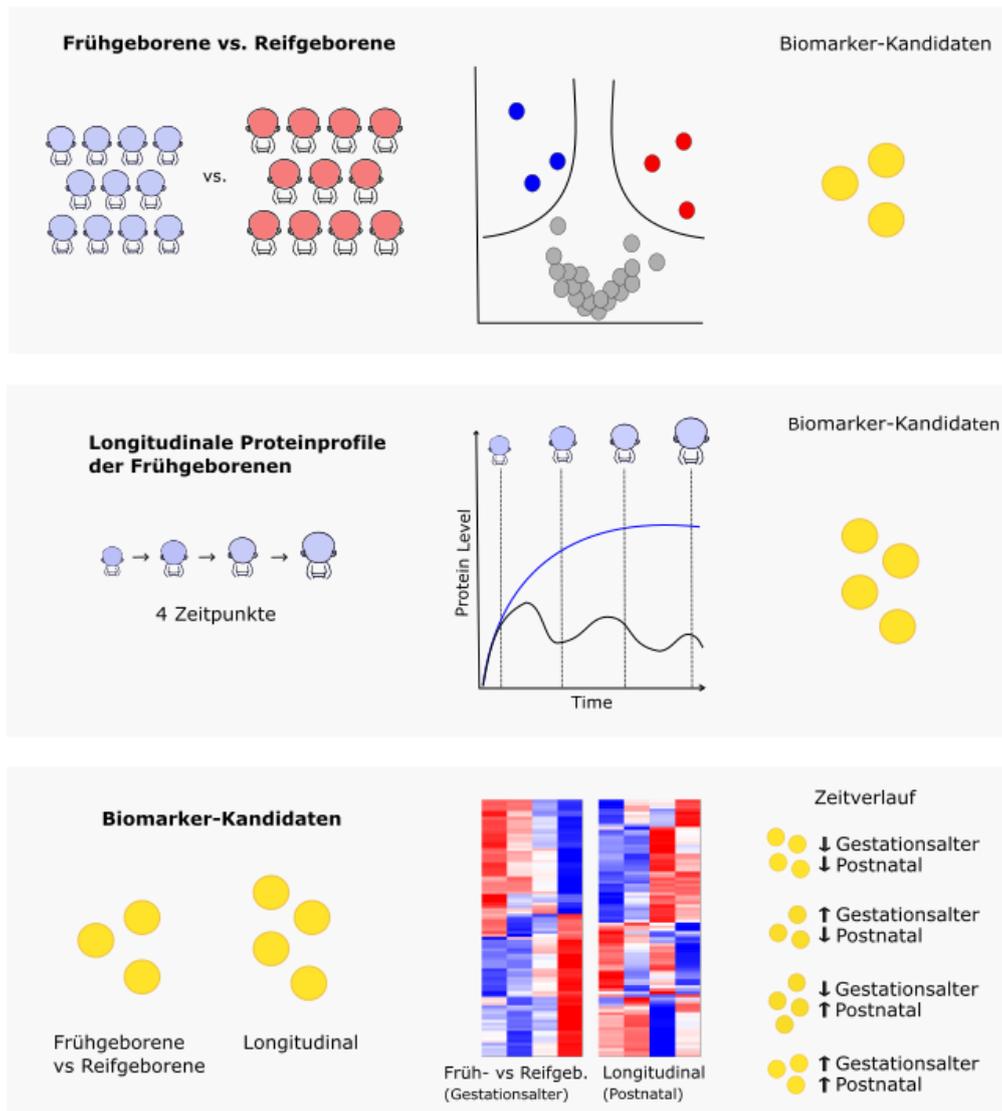


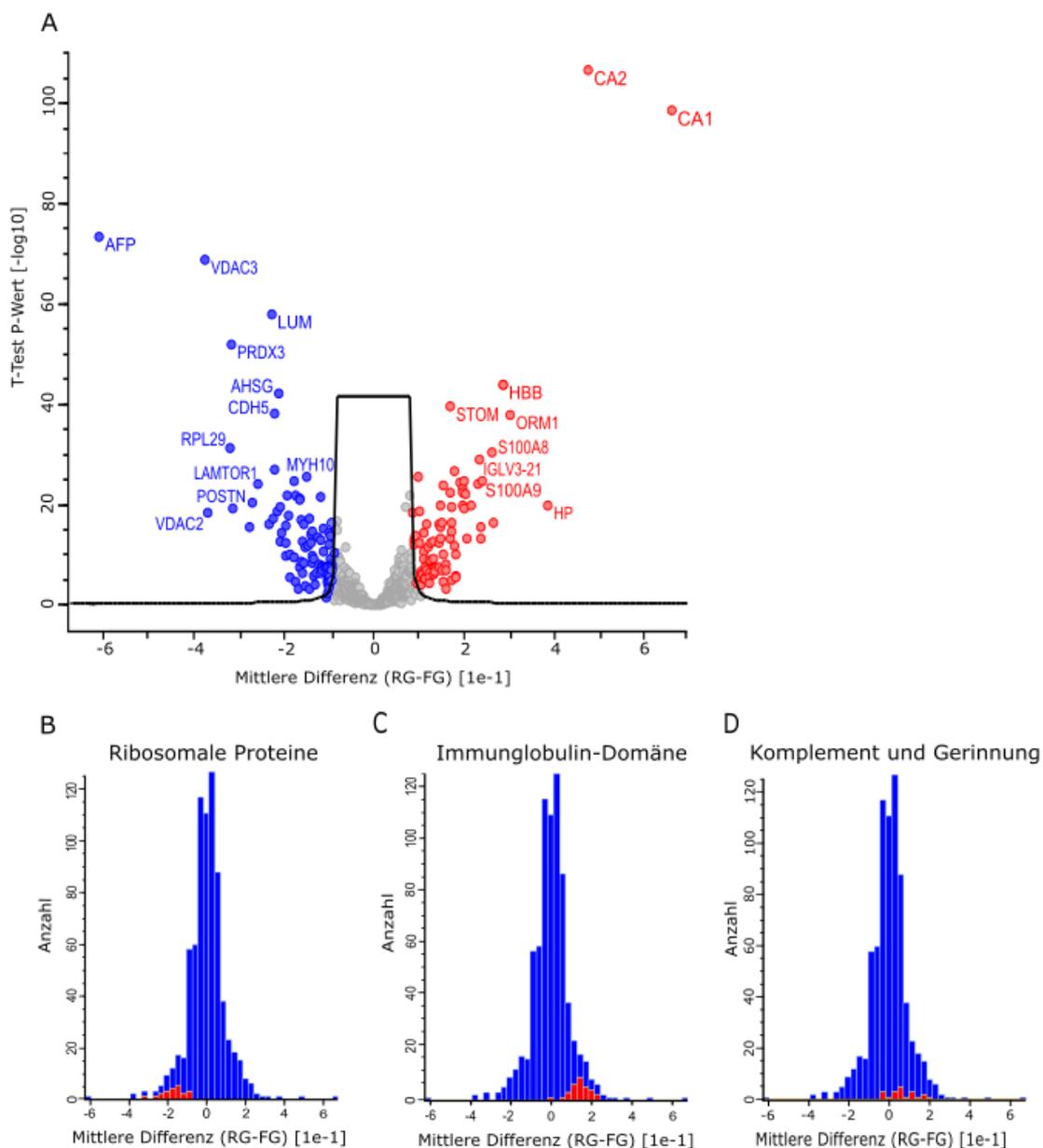
Abbildung 7: Analyseschema der Entwicklung des Blutproteoms von Frühgeborenen

### 3.3.3 Basisdaten der Massenspektrometrischen Auswertung

Ein großes Vollblut-Proteom-Datenset aus 855 Blutproben wurde erstellt. Der Fokus wurde auf die 4 Hauptabnahmezeitpunkte (G, NGS, NGS 32+0, E) gelegt (N= 827). Bei einer Mindestanzahl von 400 detektierten Proteinen pro Probe wurden 813 Proben (266 FG-Datensets und 547 RG-Datensets) zur Analyse herangezogen. Insgesamt konnten 1459 Proteine mit mindestens 2 Peptiden in den Studienproben identifiziert werden. Durchschnittlich wurden 831 Proteine (SD 172, Min 414, Max 1233) pro Probe gemessen.

Um einen ersten Eindruck über die Daten bei möglichst großer statistischer Power zu erhalten, wurde das Blutproteom der FG mit dem der RG zu allen 4 Zeitpunkten verglichen (Abb. 8A). Die beiden Gruppen unterschieden sich signifikant in 178 Proteinen. Die signifikantesten Proteine spiegeln grundlegende, z.T. bereits bekannte biologische Prozesse wider. Alpha-Fetoprotein (**AFP**), eine

neonatale Form von Albumin, war in der Gruppe der FG 4-fach erhöht ( $p=3,5 \times 10^{-74}$ ), wohingegen die Carboanhydrase 1 und 2 (**CA1** und **CA2**) 5- bzw. 3-fach erniedrigt war ( $p=3,3 \times 10^{-99}$  bzw.  $p=1,9 \times 10^{-107}$ ). Die Proteine wurden mit Gene Ontology biological process (GOBP), molekularer Funktion (GOMF), zellulärem Kompartiment (GOCC) und Uni-Prot-KB-Keywords annotiert, um biologische Prozesse aufzudecken (Abb. 8B-D). Während die GO-Annotierung „ribosomal“ v.a. unter den höher exprimierten Proteinen der FG zu finden war, waren die GO-Annotierungen „Immunglobulin-domäne“, „Komplement“ und „Gerinnung“ in den unter exprimierten Proteinen der FG bzw. höher exprimierten Proteinen der RG angereichert. „Hämoglobin“ und „Apolipoproteine“ zeigten sich über beide Gruppen ungefähr gleich verteilt (ergänzende Abb. 1).



**Abbildung 8: Vergleich von Früh- und Reifgeborenen**

**A) Volcano Plot der Proteine zu allen 4 Hautabnahmezeitpunkten.** Die X-Achse zeigt die Mittlere Differenz der Protein-Intensitäten, die y-Achse den  $-\log_{10}$  T-Test P-Wert an. Signifikant erhöhte Proteine (N=178) in der Gruppe der FG sind blau, in der Gruppe der RG rot dargestellt.

**B-D) Histogramm.** Der Anteil an (B) Ribosomalen Proteinen, (C) der Immunglobulindomäne sowie (D) Proteinen des Komplement- und Gerinnungssystems ist rot markiert.

### **3.3.4 Querschnittsdaten: Vergleich des Proteoms von Früh- und Reifgeborenen**

#### **3.3.4.1 Vergleich von Früh- und Reifgeborenen zum Zeitpunkt G (Intrauterine Entwicklung)**

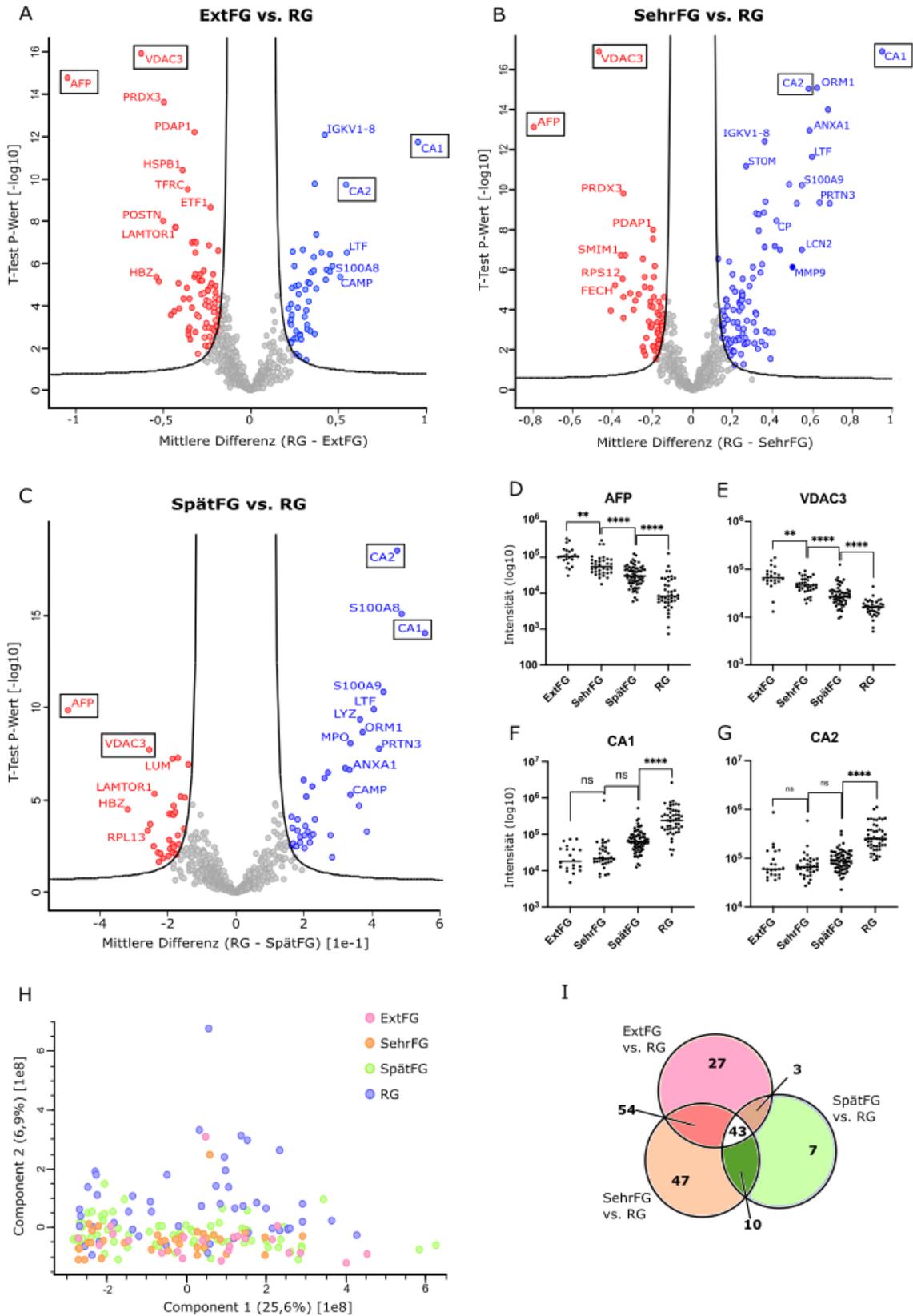
Um den Einfluss des GA auf das Blutproteom beurteilen zu können, wurden die FG in 3 Gruppen (ExtFG, SehrFG, SpätFG) unterteilt und mit der Vergleichskohorte der RG zu den einzelnen Abnahmezeitpunkten (G, NGS, E) verglichen. Der Fokus lag auf dem Geburtszeitpunkt, um mögliche Aussagen über die intrauterine Entwicklung zu treffen.

ExtFG unterschieden sich zum Zeitpunkt G in 129 Proteinen, SehrFG in 162 und SpätFG in 73 Proteinen von der Vergleichskohorte der RG (T-Test,  $p < 0,01$ , permutationsbasierte FDR  $< 0,05$ ) (Abb. 9 A-C). Bei stellvertretender Betrachtung der Proteinintensitäten der signifikantesten Proteine (AFP, VDAC3, CA1 und CA2) aus Abb. 9 A-C an, konnte ein ansteigender bzw. fallender Verlauf entlang der anhand des GA vordefinierten Gruppen beobachtet werden (Abb. 9 D-G). Der Einfluss des GA wurde ebenso durch die Anzahl der signifikanten Proteine deutlich, in denen sich die FG-Gruppen von den RG unterschieden und welche mit steigendem GA abnahm. 43 der signifikant veränderten Proteine unterschieden sich in allen FG-Gruppen von den RG, 27 weitere nur für ExtFG, 47 für SehrFG und 7 für SpätFG (Abb. 9I).

Ribosomale Proteine und Immunglobuline zeigten fast ausschließlich signifikante Änderungen bei ExtFG und SehrFG im Vergleich zu RG. Komplementfaktoren dagegen unterschieden sich signifikant v.a. in der Gruppe der SehrFG. Proteine des angeborenen und erworbenen Immunsystems sowie mit antimikrobieller Eigenschaft entwickelten sich über alle FG-Gruppen (ExtFG bis zu RG), insbesondere jedoch in der Gruppe der SehrFG.

Daneben konnten Proteine, die mit der Organentwicklung bzw. Reifung oder kongenitalen Fehlbildungen assoziiert sind, identifiziert werden. Die Unterschiede zwischen FG und RG waren jedoch nur geringgradig und weniger signifikant.

In der Hauptkomponentenanalyse (PCA) repräsentierte Komponente 2 die Änderung durch das GA bei Geburt, anhand dessen die GA-definierten Gruppen auseinander clustern (Abb. 9 H).



**Abbildung 9: Querschnitt- Vergleich der Frühgeborenen-Gruppen mit Reifgeborenen zum Zeitpunkt Geburt**  
**A-C) Volcano-Plots.** Mittels T-Test erfolgte der Vergleich der FG-Gruppen mit der RG-Kontrollgruppe zum Zeitpunkt G. Insgesamt waren bei (A) ExtFG 129 Proteine, (B) bei SehrFG 162 und (C) bei SpätFG 73 Proteine

signifikant verändert. Die X-Achse definiert die mittlere Differenz zwischen FG und RG. Die Y-Achse gibt den log<sub>10</sub> T-Test P-Wert an. Signifikant erhöhte Proteine in der Gruppe der FG sind rot, in der Gruppe der RG blau markiert.

**D-G) Box-Plots** der statistisch signifikantesten Proteine aus Abb. 9 A-C).

**H) PCA** (Hauptkomponentenanalyse) der anhand des GA definierten Gruppen.

**I) Querschnitt.** Anzahl der Proteine aus Abb. 9A-C), die sich für die einzelnen Gruppen getrennt bzw. gemeinsam von den RG unterscheiden.

Signifikante Proteine aus Abb. 9 A-C (N=200), die sich in mindestens einer FG-Gruppe von den RG zum Zeitpunkt G unterschieden, wurden Z-gescored und die Mediane einer hierarchischen Clusteranalyse unterzogen. Proteine mit ähnlichem Verlauf über das GA lagerten zusammen, sodass 2 Hauptcluster definiert werden konnten (Abb. 10). Proteine, die über das GA abnehmen, wurden in Cluster 1 (N=95) zusammengefasst. Neben dem Stellvertreter AFP waren dies v.a. ribosomale Proteine. Cluster 2 (N=105) beschrieb Proteine, die über das GA zunahmen und wurde durch das Protein Hemoglobin subunit beta (**HBB**) repräsentiert. Cluster 2 konnte des Weiteren in kontinuierlich zunehmende (Cluster 2b, N=65) und nach einem Abfall ansteigende Proteinintensitäten eingeteilt werden (Cluster 2a, N=40). Cluster 2a enthielt Proteine aus der Gruppe der Histone, während in Cluster 2b vor allem Immunglobuline vertreten waren. Proteine der Komplementkaskade, Gerinnung sowie des angeborenen und erworbenen Immunsystems verteilten sich über den gesamten Cluster 2 (Abb. 11).

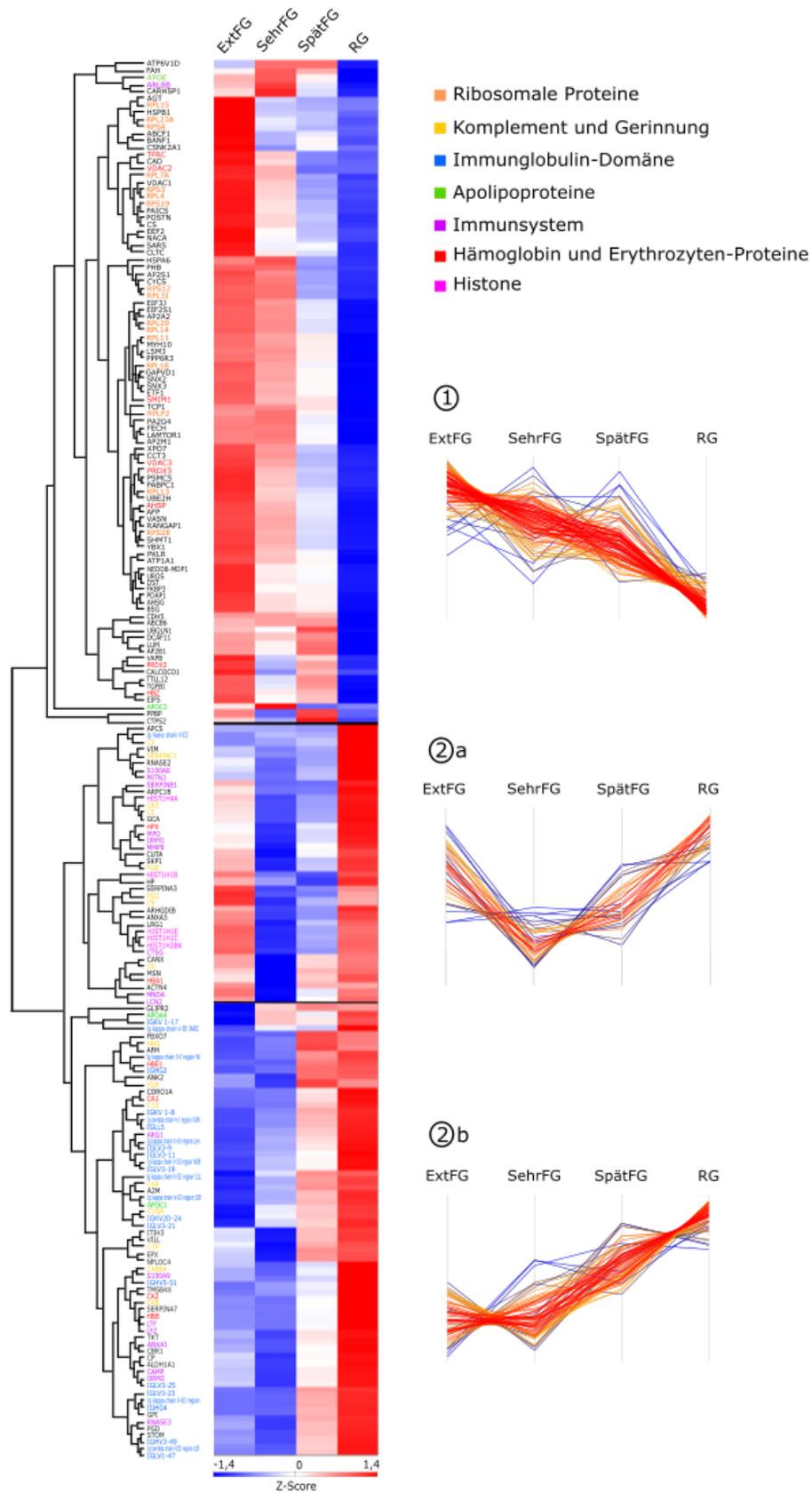
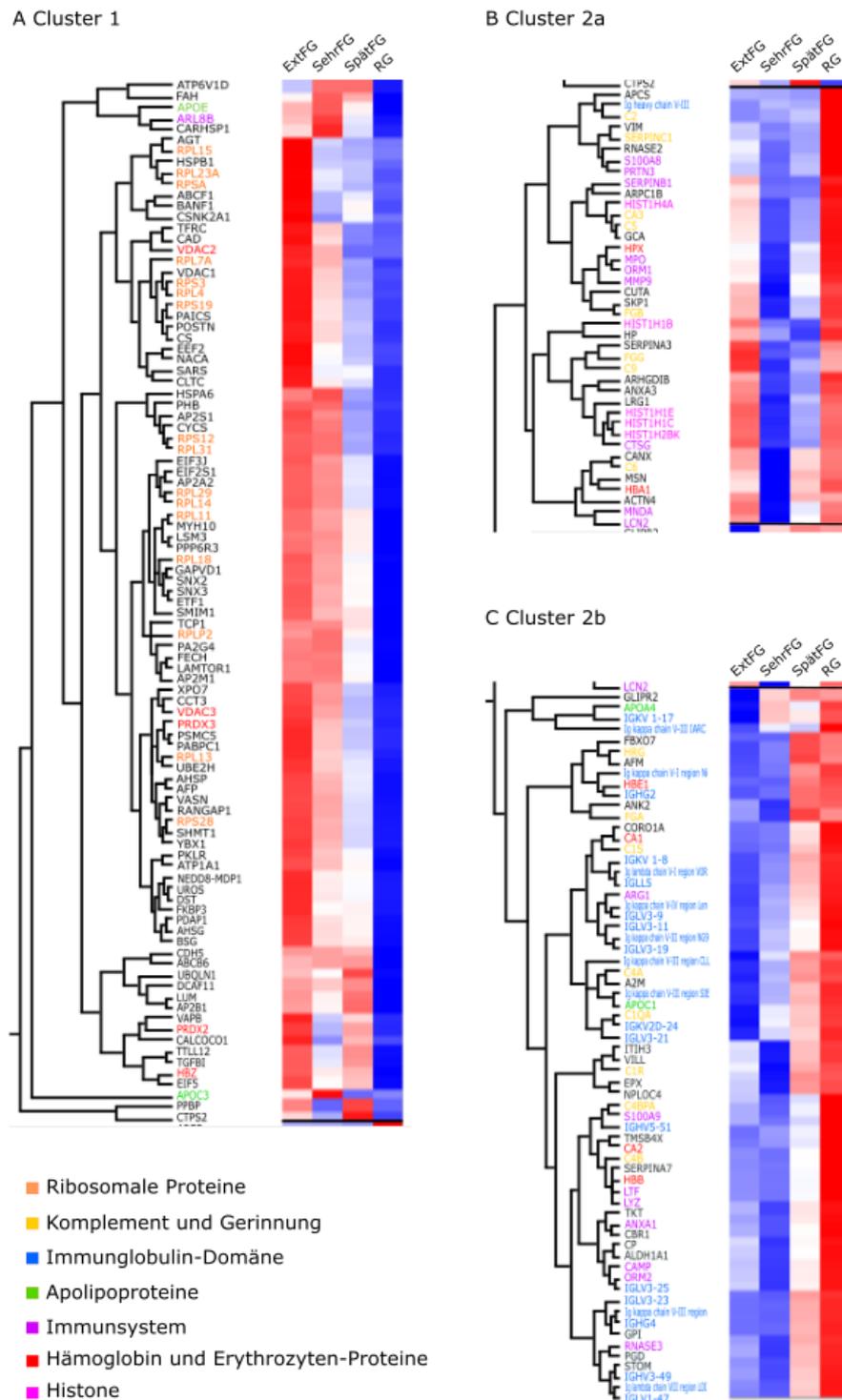


Abbildung 10: Gestationsalterabhängiger Verlauf der signifikanten Proteine aus Vergleich der Früh- und Reifgeborenen zum Zeitpunkt G

Heat Map der signifikanten Proteine (N= 200), die sich in mindestens einer FG-Gruppe von der Kontrollgruppe der RG zum Zeitpunkt G unterschieden. Es erfolgte ein hierarchisches Clustering der Z-gesorteten Mediane der LFQ-Intensitäten. Die Balken fassen Proteine mit ähnlichem zeitlichem Verlauf über das GA zusammen (N<sub>Cluster 1</sub> = 95, N<sub>Cluster2a</sub>= 40, N<sub>Cluster 2b</sub>= 65) mit zusätzlicher Farbkodierung für den Abstand von der Mitte. Proteine in gleicher Farbe haben eine ähnliche Funktion.



**Abbildung 11: Cluster aus Vergleich der Früh- und Reifgeborenen**

Die Cluster 1, 2a und 2b aus Abb. 10 sind zur besseren Übersicht nochmals in vergrößerter Form dargestellt.

### 3.3.4.2 Vergleich von Früh- und Reifgeborenen zum Zeitpunkt NGS, NGS32+0 und E

Die FG-Gruppen wurden darüber hinaus zu den weiteren Abnahmezeitpunkten NGS und E mit der Kontrollgruppe der RG verglichen (Tab. 8).

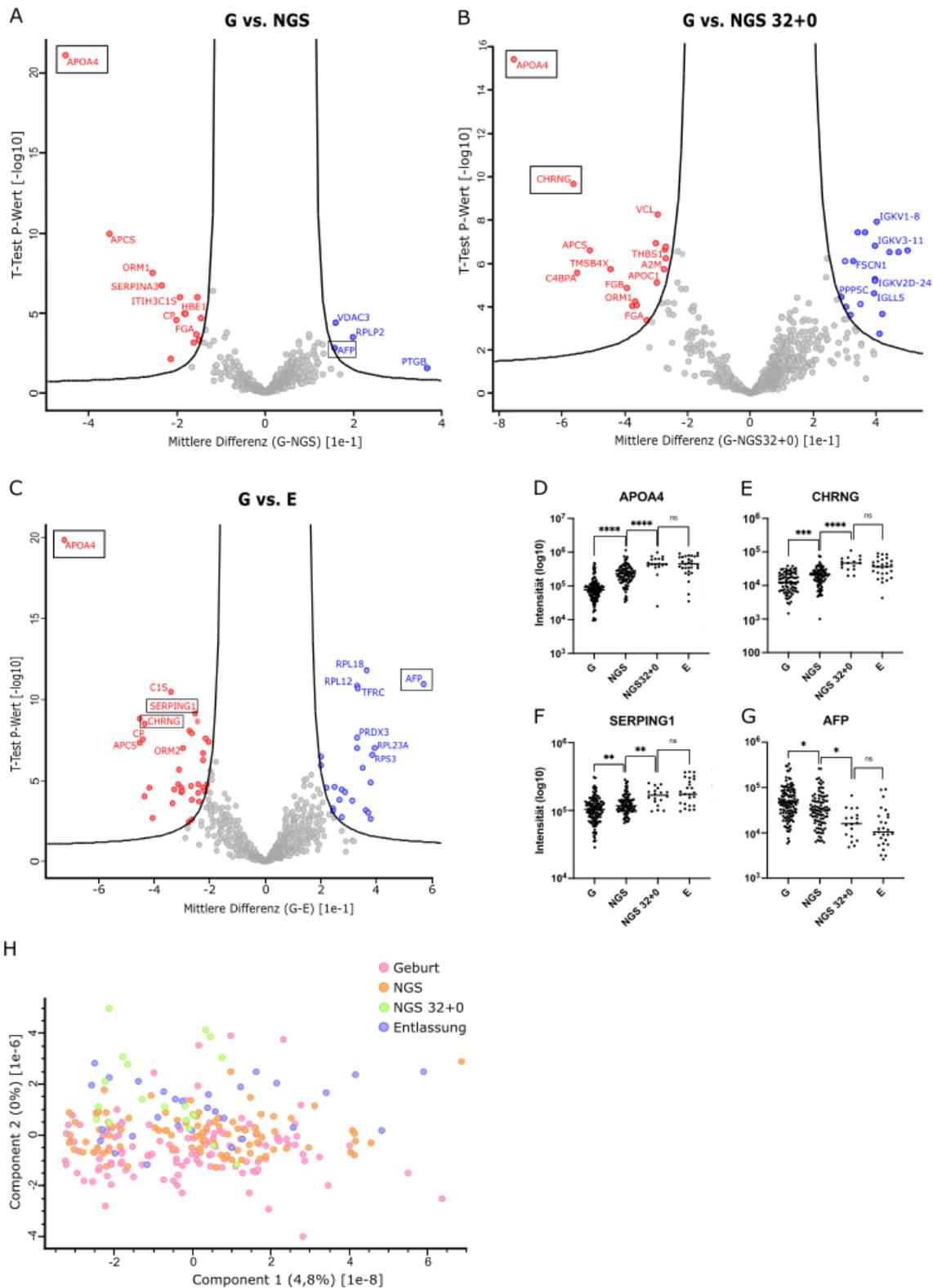
N Proteine	FG vs. RG	ExtFG vs. RG	SehrFG vs. RG	SpätFG vs. RG	Ext vs. Spät	Ext vs. Sehr	Sehr vs Spät
Geburt	90	129	162	73	14	0	4
NGS	13	7	6	9	2	0	6
NGS 2	-	-	-	-	-	0	-
Entlassung	17	38	1	3	8	0	0

**Tabelle 8: Anzahl der signifikanten Proteine bei Vergleich von Früh- und Reifgeborenen zum Zeitpunkt G, NGS, NGS 32+0 und E**

Es erfolgte ein T-Test zum Vergleich der FG-Gruppen mit der Kontrollgruppe der RG (linke Seite) sowie der FG-Gruppen untereinander (rechte Seite) zu den jeweiligen äquivalenten Abnahmezeitpunkten. Die Tabelle gibt die Anzahl signifikant veränderter Proteine (FDR 0,05) an.

### 3.3.5 Longitudinale Daten: Postnatale Entwicklung des Proteoms Frühgeborener

Für die zweite Zeitdimension wurde die postnatale Entwicklung von FG untersucht. Dazu wurden alle longitudinalen Abnahmepunkte mit dem Basiszeitpunkt G mittels T-Test verglichen, um Proteine mit einer zeitlichen Dynamik (an- bzw. absteigende Protein-Intensitäten) zu isolieren (Abb. 12A-C). Die größte Entwicklung des Proteomprofils war zum spätesten Entnahmezeitpunkt E (N=59) zu vermerken, gefolgt von NGS 32+0 (N=35) und NGS (N=18). Unter diesen Proteinen war das bereits beschriebene **AFP** zu finden, das zwischen den einzelnen Blutentnahmezeitpunkten signifikant abnahm ( $p(E)=1,2 \times 10^{-11}$ ) (Abb. 12G). Parallel entwickelte sich Apolipoprotein A4 (**APOA4**,  $p(E)=1,4 \times 10^{-20}$ ), Acetylcholine receptor subunit gamma (**CHRNA3**,  $p(E)=3,4 \times 10^{-9}$ ) und Plasma protease C1 inhibitor (**SERPINC1**,  $p(E)=7,9 \times 10^{-10}$ ) entlang der Zeitachse positiv (Abb. 12E-G). Bei Betrachtung des Proteoms in der Hauptkomponentenanalyse stellte Komponente 2 das postnatale Alter beim Probenentnahmezeitpunkt dar (Abb. 12H).



**Abbildung 12: Longitudinal- Postnatale Dynamik des Proteinprofils Frühgeborener**

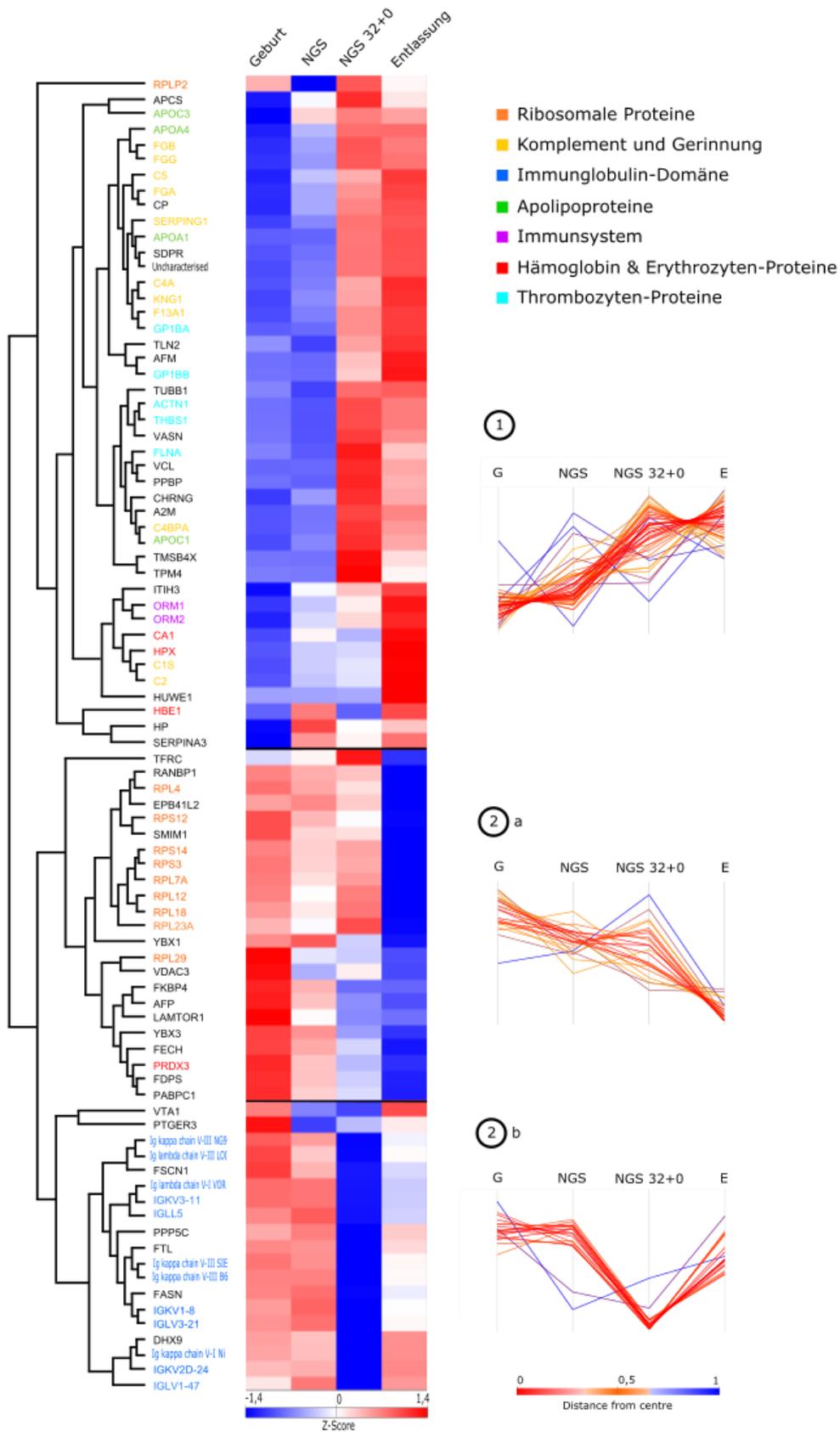
**A-C) Volcano Plots.** Die X-Achse zeigt die mittlere Differenz zwischen Geburt und dem jeweiligen longitudinalen Zeitpunkt. Die Y-Achse gibt den  $-\log_{10}$  T-Test P-Wert an. Signifikant erhöhte Proteine zum Geburtszeitpunkt sind blau, zu den longitudinalen Zeitpunkten NGS (N= 18), NGS 32+0 (N=35) und E (N=59) rot dargestellt.

**D-G) Box Plots** ausgewählter signifikanter Proteine aus Abb. 12A-C).

**H) PCA** (Hauptkomponentenanalyse) der Zeitpunkte.

Die postnatale Entwicklung des Blutproteoms wird noch deutlicher, wenn alle signifikanten Proteine betrachtet werden (N= 86), die sich in mind. 1 Follow-Up-Zeitpunkt von der Basisabnahme G unterschieden (Abb. 12A-C). Der Median der Z-gescorten Protein-Intensitäten zu allen 4 Zeitpunkten wurde berechnet und eine hierarchische Clusteranalyse erstellt (Abb. 13).

Proteine (N= 44), die postnatal anstiegen, waren in Cluster 1 zusammengefasst und enthielten Proteine aus der Gruppe der Komplement- und Gerinnungskaskade, thrombozytäre Proteine sowie Apolipoproteine. Im Gegensatz dazu fasste Cluster 2 (N= 42) Proteine mit einer fallenden Dynamik zusammen und war in 2 Subcluster unterteilbar. Dabei fanden sich in Cluster 2a (N=23) Proteine, die mit steigendem Lebensalter kontinuierlich abnahmen. Darunter waren v.a. ribosomale Proteine. Cluster 2b (N=19) beschrieb Proteine, die zuerst abnahmen und ab einem kGA von 32 SSW (NGS 32+0) wieder zunahmen. Er umfasste hauptsächlich Immunglobuline.



**Abbildung 13: Verlauf der Proteine mit signifikanter postnataler Dynamik**

Für Proteine (N= 86), die sich in mindestens einem Zeitpunkt (NGS, NGS2, E) signifikant von der Basisabnahme G unterschieden, erfolgte ein Z-Scoring der Intensitäten und eine hierarchische Cluster-Analyse wurde durchge-

führt. Anhand des zeitlichen Verlaufs kristallisierten sich 2 Hauptcluster heraus ( $N_{\text{Cluster1}}=44$ ,  $N_{\text{Cluster2a}}=23$ ,  $N_{\text{Cluster2b}}=19$ ). Die Farbmarkierung der Proteine ordnet diese einer ähnlichen Funktion zu.

Die postnatale Entwicklung wurde nochmals getrennt für alle FG-Gruppen parallel zum oben beschriebenen Vorgehen untersucht (Tab. 9).

N Proteine	G vs NGS	G vs NGS 32+0	G vs E	NGS vs NGS 32+0	NGS vs E	NGS 32+0 vs E
<b>FG</b>	18	35	59	52	36	6
<b>ExtFG</b>	0	47	83	13	49	0
<b>SehrFG</b>	3	20	1	4	1	0
<b>SpätFG</b>	2	-	7	-	0	-

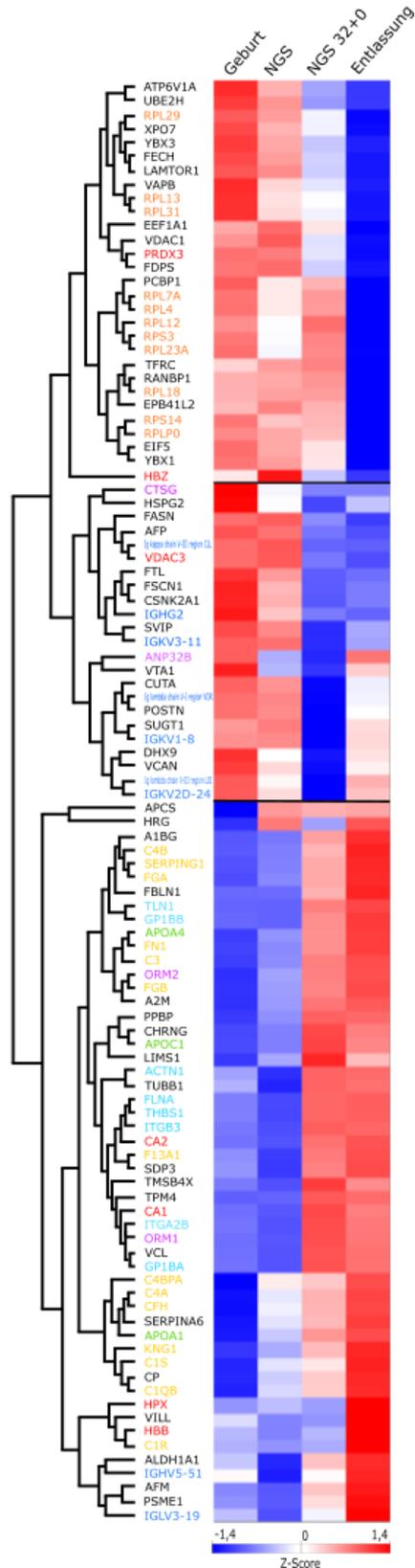
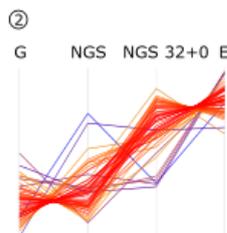
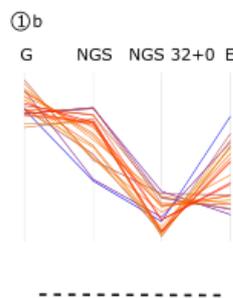
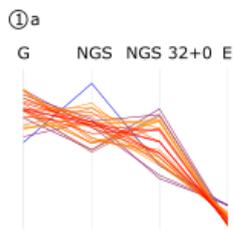
**Tabelle 9: Anzahl der signifikanten Proteine beim Vergleich der Abnahmezeitpunkte**

Es erfolgte ein T-Test zum Vergleich der Follow-Up-Entnahmezeitpunkte mit der Basisabnahme G und untereinander. Die Tabelle gibt die Anzahl signifikant veränderter Proteine (FDR 0,05) wieder.

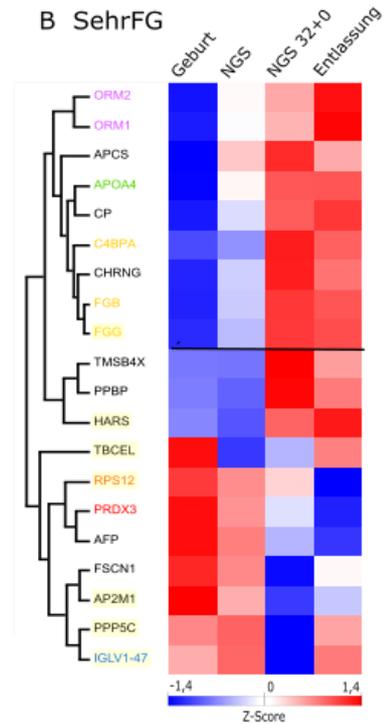
Bei ExtFG zeigte das Proteomprofil die größte Veränderung ( $M=104$ ) (Abb. 14A) im Vergleich zu SehrFG ( $N=20$ ) (Abb. 14B) und SpätFG ( $N=8$ ) (Abb. 14C). In der hierarchischen Clusteranalyse konnten jeweils 2 Cluster (zu- und abnehmende Proteine) definiert werden.

Nur 3 Proteine (APOA4, Serum amyloid P-component (APCS), CHRNG) zeigten eine signifikante Dynamik in allen 3 FG-Gruppen. In ExtFG unterschieden sich 88 Proteine signifikant in mindestens einem Zeitpunkt von der Basisabnahme G. Darunter waren Proteine aus der Gruppe der Immunglobuline ( $N=9$ ), ribosomale Proteine ( $N=8$ ) und Proteine der Gerinnungs- und Komplementkaskade ( $N=10$ ) vertreten. 7 weitere Proteine zeigten eine zeitliche Änderung nur bei SehrFG, 2 weitere nur in der Gruppe der SpätFG (E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1 (**HUWE1**), Small integral membrane protein 1 (**SMIM1**)). Diese sind in Abb. 14 B und C farblich gelb hinterlegt. Darüber hinaus waren 10 Proteine bei ExtFG und SehrFG (u.a. AFP, Alpha-1-acid glycoprotein 1 und 2 (**ORM1** und **ORM2**)) und 3 in der Gruppe der ExtFG sowie SpätFG (ausschließlich ribosomale Proteine) im zeitlichen Verlauf verändert.

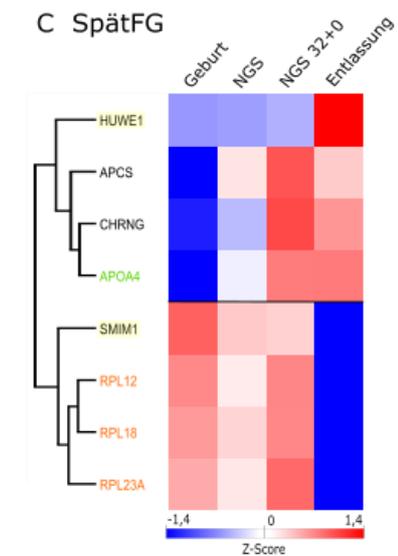
### A ExtFG



### B SehrFG



### C SpätFG



- Ribosomale Proteine
- Komplement und Gerinnung
- Immunglobulin-Domäne
- Apolipoproteine
- Hämoglobin & Erythrozyten-Proteine
- Thrombozyten-Proteine

**Abbildung 14: Postnataler Verlauf des Proteomprofils der Frühgeborenen-Gruppen**

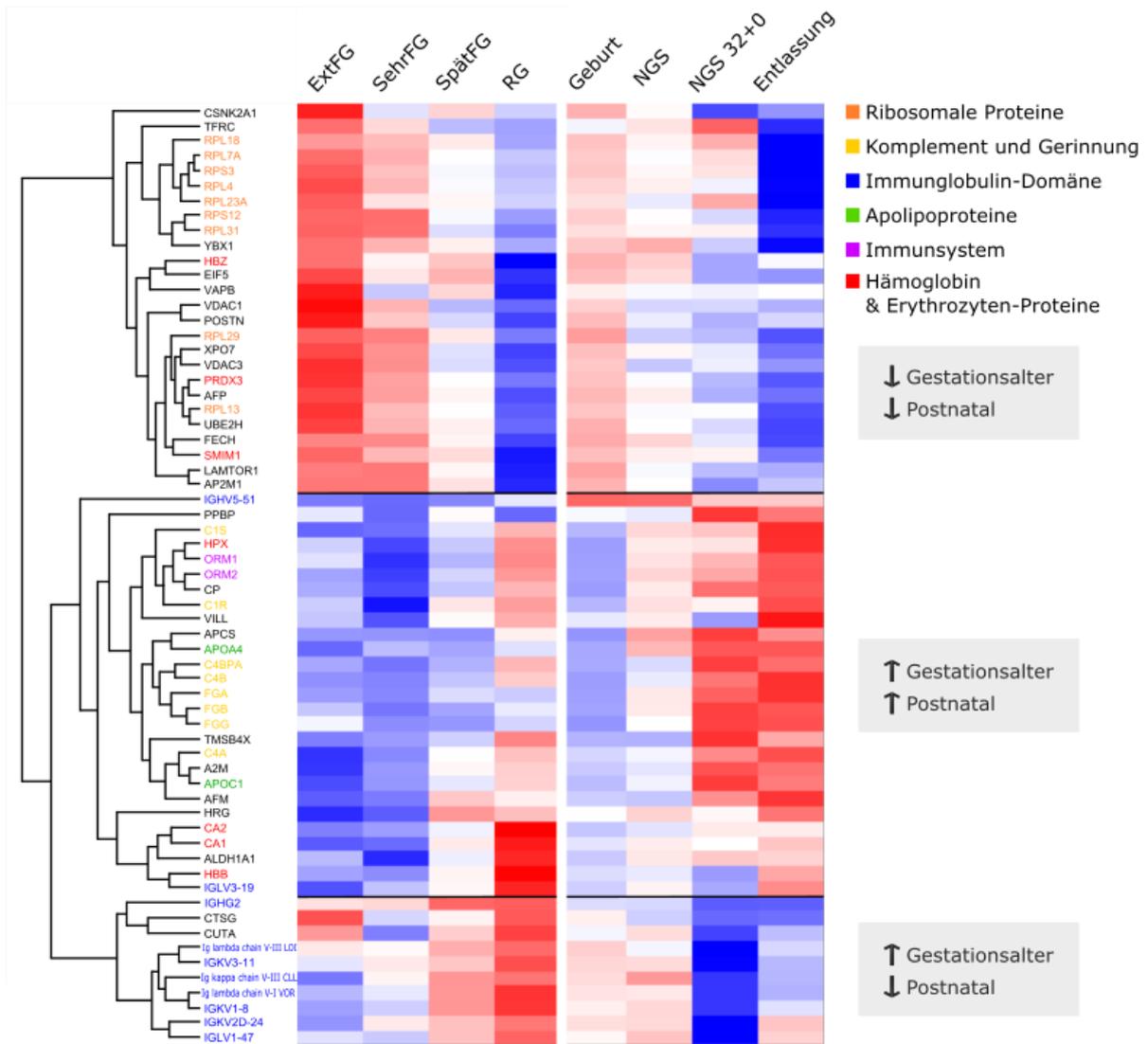
Für (A) ExtFG (N=104), (B) SehrFG (N=20) und (C) SpätFG (N=8) wurde für die Proteine mit einer zeitlichen Dynamik eine hierarchische Clusteranalyse durchgeführt. Zuvor wurden die Proteinintensitäten Z-gescoret. Proteine mit einer ähnlichen Funktion sind in gleicher Farbe markiert. Die gelb hinterlegten Proteine in B) und C) änderten

sich jeweils nur bei SehrFG und SpätFG, nicht jedoch bei ExtFG. Die Proteine jeder Heat Map konnten anhand ihrer Dynamik in 2 Gruppen unterteilt werden (zu- und abnehmend), was durch den schwarzen Trennbalken verdeutlicht wird.

### 3.3.6 Vergleich der Querschnitts- und longitudinalen Daten (Gestationsalter vs. postnatal)

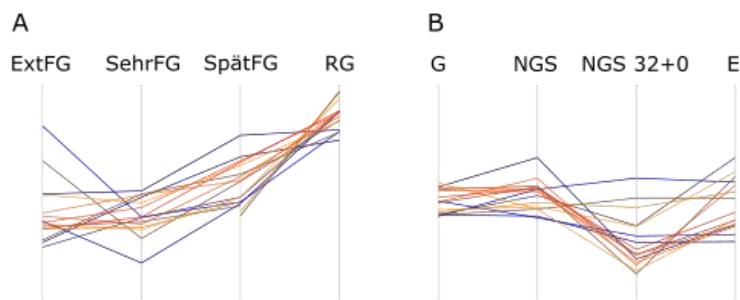
In einem dritten Schritt wurde eine Schnittmenge (N= 63) aus Proteinen gebildet, die sich sowohl über das GA als auch postnatal (Abb. 10 und 14) signifikant veränderten, und deren Verlauf über beiden Zeitachsen verglichen. Es erfolgte eine hierarchische Clusteranalyse der Z-gescoreten Mediane anhand des GA als auch des longitudinalen Verlaufs (G, NGS, NGS 32+0, E). In der entstehenden Heat Map konnten 3 Cluster definiert werden (Abb. 15).

Cluster 1 (N= 26) fasste alle Proteine zusammen, die über das GA sowie postnatal abnahmen. Ein bekannter Vertreter dieser Gruppe war AFP, sowie die hoch signifikanten mitochondrialen Proteine Voltage-dependent anion-selective channel protein 3 (**VDAC3**) und Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial (**PRDX3**). Hier waren vor allem ribosomale und mitochondriale Proteine (N= 9) vertreten. Parallel dazu enthielt Cluster 2 Proteine (N=22), die über beide Zeitachsen zunahmen. Hierzu zählten neben CA1 und CA2, Proteine der Gerinnungs- und Komplementkaskade (N= 8), Apolipoproteine (N= 2) und Proteine, die im Zusammenhang mit dem Immunsystem stehen (ORM1, ORM2). Proteine, die mit steigendem GA zunahmen, im longitudinalen postnatalen Verlauf jedoch abfielen, sind in Cluster 3 (N= 15) zusammengefasst und waren v.a. der Gruppe der Immunglobuline zuzuordnen (N=9). In Cluster 3 ist auf den gesonderten zeitlichen postnatalen Verlauf der Protein-Intensitäten hinzuweisen, welche erst bis zum NGS 32+0 abfielen und zum Zeitpunkt E wieder anstiegen (Abb. 16).



**Abbildung 15: Vergleich der gestationsalterabhängigen und postnatalen Proteindynamik**

Nach einem Z-Scoring der Proteinintensitäten erfolgte eine hierarchische Clusteranalyse der gemeinsamen Schnittmenge der Proteine aus Abb. 10 und Abb. 14 (N=63). Anhand der Proteindynamik über beide Heat-Maps (Querschnitt und longitudinale Daten) konnten 3 Cluster definiert werden. Während die Proteinintensitäten in Cluster 1 (N=26) über beide Zeitachsen abnahmen, stiegen diese parallel dazu in Cluster 2 (N=22) an. Proteine in Cluster 3 hingegen (N=15) nahmen mit steigendem GA zu, zeigten jedoch im postnatalen Verlauf eine fallende Dynamik. Proteine mit ähnlicher Funktion sind in gleicher Farbe markiert.



**Abbildung 16: Dynamik der Proteine (N=15) aus Cluster 3**

Cluster Profile Plot der Proteine aus Cluster 3 (N=15) (Abb. 15) mit Darstellung der Protein-Dynamik über das (A) GA und (B) den longitudinalen, postnatalen Verlauf.

### 3.3.7 Vergleich des Proteoms von Frühgeborenen mit gleichem (korrigierten) Gestationsalter

Ziel war es, Unterschiede in der intra- und extrauterinen Entwicklung und die Frage nach einer adäquaten extrauterinen „Nachreifung“ der FG beurteilen zu können. Dazu wurden ExtFG und SehrFG (N=17, durchschnittliches GA von  $27 \pm 2$  SSW) bei einem kGA von 32 SSW (durchschnittlich  $4 \pm 2$  Wochen nach Geburt) mit dem Geburtszeitpunkt von FG (N=14) verglichen, die nach 32 bzw. 33 SSW geboren wurden (Abb. 17A).

95 Proteine unterschieden sich signifikant zwischen den Gruppen (Abb. 17B). Ein Großteil dieser Proteine hatte ebenfalls eine Dynamik über mind. eine der beiden Zeitachsen gezeigt (Abb. 10 und 14). Bei erneuter Berücksichtigung der GO-Annotierung, konnten keine ribosomale Proteine gefunden werden. Demzufolge scheint es für ribosomale Proteine keinen Unterschied zwischen der intra- und extrauterinen Entwicklung zu geben. Immunglobuline (N=17) waren vermehrt zum Geburtszeitpunkt von FG, die nach 32 bzw. 33 SSW geboren wurden, vorhanden. Dies stimmt mit der bereits gezeigten zeitlichen Entwicklung der Immunglobuline überein, die über das GA bei Geburt zunahm und postnatal abnahm (Abb. 16). Proteine des Komplementsystems (N=7), thrombozytäre Proteine (N= 3) und Apolipoproteine (N=3) waren im Gegensatz dazu vermehrt bei einem kGA von 32 SSW vertreten. In Kombination mit der Zunahme dieser Proteine über das GA als auch postnatal, scheinen sich die Proteine des Komplementsystems und Apolipoproteine postnatal (d.h. in einer extrauterinen Umgebung) schneller anzupassen.

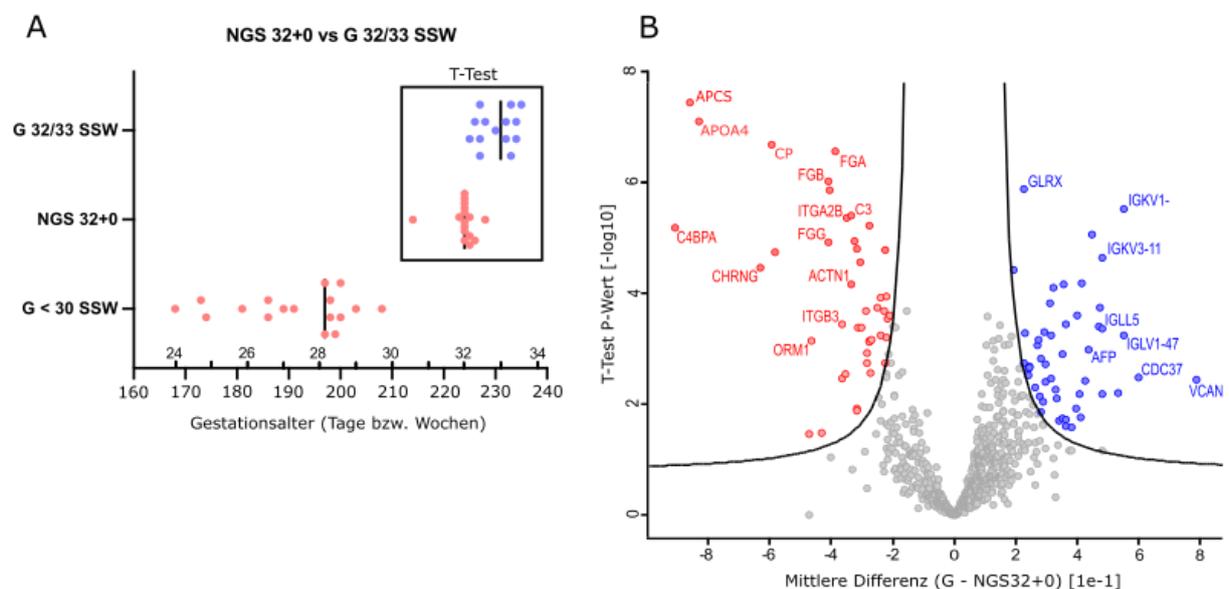


Abbildung 17: Vergleich von Frühgeborenen bei Geburt mit GA <32 SSW und bei kGA von 32 SSW

**A) Übersicht** über GA der FG bei Geburt und kGA bei NGS 32+0.

**B) Volcano Plot.** Die X-Achse zeigt die mittlere Differenz zwischen Geburt und Entlassung an, während die Y-Achse den  $-\log_{10}$  T-Test P-Wert angibt. Signifikant erhöhte Proteine (N= 95) zum Geburts-Zeitpunkt sind blau (N=51), zum NGS 32+0 rot (N=44) markiert.

### **3.3.8 Proteine im Zusammenhang mit der Organogenese**

Für Proteine, die eine zeitliche Dynamik über mind. 1 der beiden Zeitachsen (Abb. 6 und 9) zeigten, wurde in UniProt und der Literatur nach Hinweisen, für eine mögliche Beteiligung dieser Proteine in der Organogenese gesucht. Zusätzlich wurden Proteine berücksichtigt, deren veränderte Expression zu einer Fehlbildung von Organen führt und die dementsprechend ebenfalls bei der Organentwicklung beteiligt sind (Abb. 18).

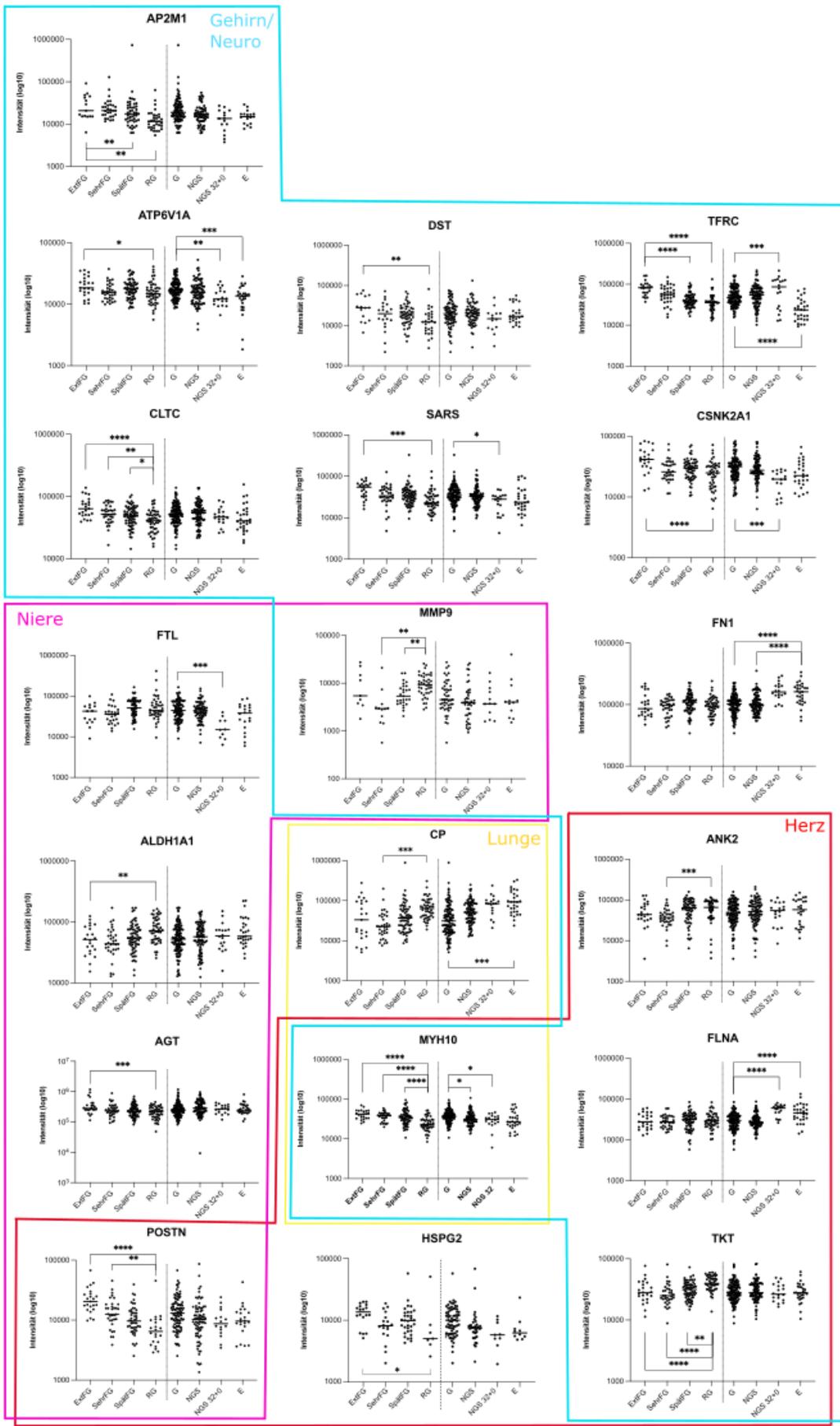


Abbildung 18: Proteine in Zusammenhang mit der Organogenese

Für Proteine, die mit der Organentwicklung assoziiert sind, wurden Box Plots entlang des GA- und postnatalen Alters erstellt. Der farbige Rahmen ordnet die Proteine den jeweiligen Organsystemen zu. Signifikante Änderungen beim T-Test Vergleich der FG-Gruppen mit der Kontrollgruppe der RG bzw. bei Vergleich der longitudinalen Abnahmepunkte mit dem Basiszeitpunkt G sind entsprechend markiert (\*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*  $p \leq 0,05$ ).

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung

Frühgeburtlichkeit ist mit einer erhöhten Mortalität und Morbidität assoziiert (9, 20, 39). Typische Erkrankungen des FG sind auf die Unreife des Organismus zurückzuführen (52, 53). Im Blut zirkulieren tausende an Proteinen (Proteom), die Auskunft über die physiologische Entwicklung, Erkrankungen, oder den allgemeinen Gesundheitszustand geben. Mit der MS wurde eine Methodik etabliert, die im Gegensatz zu herkömmlichen Methoden all diese Proteine in einer unvoreingenommenen Herangehensweise gleichzeitig erfasst (118, 122). So können nicht nur einzelne Biomarker, sondern vielmehr Proteinmuster für die GA-abhängige und postnatale Entwicklung von FG etabliert werden.

Blut setzt sich aus den zellulären Bestandteilen (37-50%) und dem flüssigen Blutplasma (50-63%) zusammen (125, 126). Erythrozyten machen mit 95 Vol.-% den größten zellulären Anteil aus. Beim Vergleich des Blutproteoms von FG und RG (Einfluss des GA) waren insbesondere erythrozytäre Proteine hochsignifikant verändert. Die Carboanhydrasen 1 und 2 (CA1 und CA2) waren bei RG vermehrt angereichert und spiegeln das vermehrte Vorhandensein von reifen Erythrozyten wider (184, 185). Im Gegensatz dazu war das Voltage-dependent anion channel gene 3 (VDAC3) in allen 3 FG-Gruppen (ExtFG, SehrFG, SpätFG) hochsignifikant erhöht. VDAC3 formt einen Kanal an der mitochondrialen Außenmembran (186) und konnte u.a. auf späten Vorläuferzellen von Erythrozyten detektiert werden (187).

Plasma enthält insbesondere Proteine mit einer funktionellen Rolle im Blut (Plasmaproteine). Diese machen den Großteil des Plasmaproteoms aus und sind in den höchsten Konzentrationen vorhanden (119). Die Proteine konnten anhand ihrer Dynamik über die beiden untersuchten Zeitachsen (GA und postnatale Entwicklung) in zu- und abnehmend eingeteilt und 3 Gruppen definiert werden. (1) Proteine, die sowohl über das GA als auch postnatal abnahmen, umfassen vor allem ribosomale Proteine. Ein weiterer bekannter Vertreter dieser Gruppe ist Alpha-Fetoprotein (AFP). (2) In der zweiten Gruppe wurden Proteine zusammengefasst, die über beide Zeitachsen zunehmen. Dazu zählen Apolipoproteine, Proteine der Gerinnungs- und Komplementkaskade und Proteine, die mit einer Immunantwort assoziiert sind. Insbesondere das Apolipoprotein APOA4 zeigte postnatal eine hochsignifikante steigende Dynamik. (3) Die dritte Gruppe beschreibt Proteine, die über das GA zunehmen und postnatal abnehmen und besteht vorwiegend aus Immunglobulinen.

Ribosomale Proteine und Immunglobuline zeigten eine GA-abhängige Dynamik fast ausschließlich in ExtFG und SehrFG, wohingegen sich Gerinnungs- und Komplementfaktoren v.a. um das GA von SehrFG änderten. Proteine des angeborenen und erworbenen Immunsystems entwickelten sich über alle FG-Gruppen zu RG. Die größte Entwicklung wird von ExtFG durchlaufen, was sich in der Anzahl veränderter Proteine über das GA und postnatal zeigte.

Daneben sind in geringeren Konzentrationen Proteine zu finden, die u.a. im Rahmen eines Gewebeschadens oder Zelltod von Organen ins Blut freigesetzt werden (119). Bei Neugeborenen steht im Gegensatz zu Erwachsenen vor allem die Organogenese im Vordergrund. Die physiologische Organentwicklung folgt einem stereotypen Muster, das durch die Frühgeburtlichkeit unterbrochen und die Exposition gegenüber extrauterinen Faktoren beeinträchtigt wird (67, 74, 188, 189). Damit einhergehende Organdysfunktionen und typische Erkrankungen des Frühgeborenenalters korrelieren umgekehrt proportional mit dem GA. Proteine mit einer zeitlichen Dynamik über mindestens einer der Zeitachsen waren vor allem mit einer neurologischen, kardialen, renalen und pulmonalen Organentwicklung assoziiert.

Das Immun- und Komplementsystem von FG und RG unterscheidet sich bei Geburt, gleicht sich jedoch in der Entwicklung postnatal nach ca. 3 Monaten an (98, 114). Die intrauterine Organogenese von z.B. Lunge oder Niere auf der anderen Seite wird durch eine Frühgeburtlichkeit beeinträchtigt und kann extrauterin nicht kompensiert werden. Histopathologisch wird dies durch eine persistierende reduzierte Anzahl an Alveolen bzw. Glomeruli sichtbar (81, 190). Demzufolge stellte sich die Frage, ob das Blutproteom intra- und extrauterin eine vergleichbare Entwicklung durchläuft. Dazu wurden FG bei einem kGA von 32 SSW mit FG verglichen, die nach 32 bzw. 33 SSW geboren wurden. Ribosomale Proteine schienen sich in ihrer Entwicklung nicht zu unterscheiden. Proteine der Gerinnungs- und Komplementkaskade, Apolipoproteine und Proteine des Immunsystems entwickelten sich extrauterin schneller, wohingegen Immunglobuline bei einem kGA von 32 SSW weniger angereicht waren. Anhand der vorhandenen Daten kann allerdings keine Aussage darüber getroffen werden, ob die beschriebene Angleichung des Proteomprofils zu einem späteren Zeitpunkt stattfindet oder Diskrepanzen bestehen bleiben.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

Anhand der Analyse des Proteomprofils konnten Proteinmuster und potenzielle Biomarker gefunden werden, die die physiologische Entwicklung der FG widerspiegeln. Diese können zur Verbesserung des Outcomes von FG herangezogen werden. In der hierarchischen Clusteranalyse können verwandte Proteine im gleichen Cluster wiedergefunden werden, was für eine hohe technische Reliabilität der Ergebnisse spricht und eine gemeinsame, biologisch wichtige Regulation vermuten lässt. Die Diskussion des Blutproteoms wird anhand dieser funktionellen Proteingruppen erfolgen.

Die in unserer Analyse statistisch hochsignifikanten Proteine (u.a. AFP, CA1 und 2) spiegelten meist bereits bekannte Proteindynamiken wider. Ähnlich verhielt es sich mit der Entwicklung der funktionellen Plasmaproteine (Hämoglobin, Gerinnungs- und Komplementsystem, Apolipoproteine). Sie machen den Hauptteil der Blutproteine aus und sind bereits durch herkömmliche Methoden messbar. Mittels

der hypothesenfreien Herangehensweise und der hohen Sensitivität der MS konnten wir zusätzlich die Dynamik funktionell assoziierter Proteine neu beschreiben. Deren Änderung ist weniger stark ausgeprägt, aufgrund der Sensitivität der MS jedoch trotzdem detektierbar.

Frühere Studien beschrieben sowohl die GA-abhängige als auch postnatale Entwicklung der Proteine. Ein Vergleich der beiden Zeitachsen wurde bis dato jedoch noch nicht gezogen. Dieser liefert wichtige Informationen bezüglich des Einflusses einer intra- bzw. extrauterinen Umgebung auf die physiologische Entwicklung des Blutproteoms.

Auf die Abhandlung der Proteindynamik im Rahmen einer Infektion wurde bewusst verzichtet. Diese Thematik ist Bestandteil einer anderen Dissertation und wird dort ausführlich diskutiert.

#### **4.2.1 Alpha-Fetoprotein (AFP)**

Alpha-Fetoprotein (**AFP**) ist der wohl bekannteste Vertreter der Proteine, die sich abhängig von Gestations- und Lebensalter ändern. AFP ist ein neonatales Analogon von Albumin und wird von der fetalen Leber und dem Dottersack produziert (191, 192). Es zeigte eine Abnahme über beide Zeitachsen und fiel darüber hinaus in einer extrauterinen Umgebung schneller ab. Die Dynamik von AFP ist bereits umfassend untersucht, sodass sie ein wichtiges Qualitätskriterium für die Validität unserer Probenmessung darstellt. Wir konnten zeigen, dass bekannte Verläufe von Proteinintensitäten mittels unserer Methodik reproduziert werden können.

#### **4.2.2 Erythrozytäre Proteine und Hämoglobin**

Die wichtigste Aufgabe von Erythrozyten ist der Atemgastransport, der durch die Bindung von O<sub>2</sub> bzw. CO<sub>2</sub> an Hämoglobin ermöglicht wird. Die Erythropoese beschreibt den Reifungsprozess von Erythrozyten. Dies beinhaltet die Ausstoßung von Organellen (u.a. Mitochondrien) und schließlich des Zellkerns (E nukleation). Retikulozyten entstehen. Diese enthalten initial noch Reste von Zellorganellen (RNA-Reste und Ribosome) und entwickeln sich im peripheren Blut endgültig zu reifen kern- und organellenlosen Erythrozyten (193-195). In Neugeborenen nimmt die Retikulozyten-Anzahl mit steigendem GA ab (196). Mit zunehmenden Entwicklungsstufen wird das Genom schrittweise deaktiviert, sodass reife Erythrozyten primär nur noch Hämoglobin enthalten (193).

##### **Erythrozytäre Proteine**

Im Vergleich von FG und RG waren **CA1 und CA2** am signifikantesten und stärksten in RG angereichert und korrelierten sowohl mit Gestations- als auch Lebensalter positiv. Carboanhydrasen katalysieren die Konversion zwischen Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) und Bikarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) und sind Teil der Atmungskette sowie pH-Kontrolle. Die Werte Erwachsener werden erst im Kleinkindalter erreicht (184, 185).

Sie spiegeln demzufolge das vermehrte Vorliegen von reifen Erythrozyten wider. Parallel waren mitochondriale Proteine wie **VDAC3** und Thioredoxin-dependent peroxide reductase (mitochondrial) 2 und 3 (**PRDX2 und 3**) in FG vermehrt angereichert und nahmen über beide Zeitachsen ab. Dies korreliert mit dem höheren Anteil unreifer Erythrozyten in FG und kann vermutlich auch auf das postnatale Alter übertragen werden.

### **Hämoglobin**

Hämoglobin ist ein Heterotetramer aus 4 Globin-Ketten und macht über 97% der erythrozytären Proteine aus (197). Während der fetalen Entwicklung findet eine Transformation von embryonalem Hämoglobin Hb-Gower 1 ( $\zeta\zeta\epsilon\epsilon$ ) und Hb-Gower-2 ( $\alpha\alpha\epsilon\epsilon$ ) zu fetalem Hämoglobin HbF ( $\alpha\alpha\gamma\gamma$ ) und im dritten Trimester weiter zu adultem Hämoglobin HbA1 ( $\alpha\alpha\beta\beta$ ) statt (198-200). Beim Fetus macht HbF 100% des Hämoglobins aus, beim Neugeborenen nur noch ca. 75%. Den restlichen Anteil stellt HbA1. Beim Erwachsenen besteht Hämoglobin zu 97,5% aus HbA1 und zu 2,5% aus HbA2 ( $\alpha\alpha\delta\delta$ ) (199). Physiologisch ist diese Entwicklung durch eine wesentlich höhere Sauerstoff-Affinität von HbF im Vergleich zu HbA1 zu erklären, was die Umverteilung des Sauerstoffs vom maternalen in den fetalen Kreislauf ermöglicht (199).

Unsere Daten zeigten eine übereinstimmende Entwicklung. Hemoglobin subunit alpha und beta (**HBA1 und HBB**), die beiden Ketten des adulten Hämoglobins, stiegen über das GA und postnatal an, während Hemoglobin subunit zeta (**HBZ**) abnahm. HBZ ist eine alpha-ähnliche Kette des embryonalen Hämoglobins und ist vor allem in fetalen Erythrozyten zu finden (201, 202). Überraschenderweise zeigte Hemoglobin subunit epsilon (**HBE**) einen Anstieg über beide Zeitachsen. HBE1 ist eine beta-ähnliche Kette von früheren embryonalen Säugetieren (198), sodass eher eine Abnahme zu erwarten wäre. HBE konnte in (adulten) Erythrozyten-Vorläuferzellen nachgewiesen werden. Es wird spekuliert, dass es im Verlauf der Erythrozyten-Differenzierung sowohl in Neugeborenen als auch Erwachsenen zu einer Globinketten-Expression parallel zur embryonalen und fetalen Entwicklung kommt (203). Die zunehmende Detektion der embryonalen Hämoglobinkette HBE könnte das vermehrte Vorliegen von erythroiden Vorläuferzellen widerspiegeln und ist möglicherweise ein Indiz für den erhöhten Erythrozyten-Umsatz nach der Geburt.

Nach der Geburt kommt es zu einer Hämolyse (204) und Hämoglobin wird freigesetzt. Dieses wirkt oxidativ sowie inflammatorisch und schädigt insbesondere die Niere (205). Freies Hämoglobin wird durch Haptoglobin (**HP**) gebunden und der Hg/Hp-Komplex zur Leber und Milz transportiert, um dort abgebaut zu werden (206, 207). Bei Überschreiten der Haptoglobin-Kapazität wird Hämoglobin weiter zu Häm abgebaut, durch Hämopexin (**HPX**) gebunden und zur Leber transportiert. Dort findet die Eisenrückgewinnung statt (208). Parallel dazu zeigte sich ein Anstieg von **HP** und **HPX** über beide Zeit-

achsen. Bei genauer Betrachtung der Dynamik war zunächst ein Abfall von HPX bis zu einem Alter von SehrFG zu sehen, was sich auch in den Daten von Suski et al. bestätigte (170, 171). Eine ähnliche postnatale Dynamik konnte insbesondere für HP auch in RG gezeigt werden (173).

Zusätzlich konnten drei weitere Proteine gefunden werden, die mit der Erythropoese assoziiert sind und deren Dynamik bis dato in Neugeborenen noch nicht beschrieben wurde.

Alpha-hemoglobin-stabilizing protein (**AHSP**) korrelierte indirekt proportional mit dem GA. Es verhindert als Chaperon die Aggregation von alpha-Hämoglobin (209, 210). In der Literatur wurde bis jetzt vor allem auf die Rolle des Proteins in der  $\beta$ -Thalassämie und für die Bildung neuer Erythrozyten eingegangen (211), sodass wir erstmals die Bedeutung des Proteins in der Neugeborenenphase aufzeigen konnten.

Transferrin receptor protein 1 (**TFRC**) zeigte sowohl über das GA als auch postnatal eine abnehmende Dynamik. TFRC ermöglicht die Eisenaufnahme (v.a. der Leber) mittels Rezeptor-mediierter Endozytose und wird mit der Erythropoese und Entwicklung des Nervensystems assoziiert (212). TFRC2 wird zusammen mit dem Erythropoetin (Epo)-Rezeptor (EpoR) auf Erythrozyten-Vorläuferzellen exprimiert und stabilisiert EpoR auf der Zelloberfläche (213). In TFRC2-Knock out Mäusen konnte eine verminderte Sensitivität gegenüber Erythropoetin und somit eine eingeschränkte Erythropoese gezeigt werden (214).

Small integral membrane protein 1 (**SMIM1**) konnte als das charakterisierende Oberflächenprotein auf Erythrozyten der Vel-Blutgruppe identifiziert werden (215). In FG nahm das Protein sowohl über das GA als auch postnatal ab. Es wird in hohen Konzentrationen in Erythrozyten-Vorläuferzellen exprimiert und korreliert im Tiermodell positiv mit der Erythrozytenanzahl (215).

Dementsprechend spiegeln die Proteine TFRC und SMIM1 das Vorliegen von erythroiden Vorläuferzellen wider und spielen eine entscheidende Rolle in der Erythrozyten-Differenzierung. Insbesondere nach Geburt kommt es durch die Transformation von HbF zu HbA1 zu einem erhöhten Erythrozytenumsatz. Dies spiegelt sich in der hohen Konzentration von TFRC und SMIM1 bei Geburt wider, die postnatal und mit steigendem GA abnimmt. Sie stehen in ihrer Dynamik jedoch im Widerspruch zu HBE.

### **Ribosomale Proteine**

Ribosome, und damit auch die mit ihnen assoziierten ribosomalen Proteine, spiegeln den Reifegrad von Retikulozyten wider, da die ribosomale mRNA (und somit auch das Level ribosomaler Proteine) in Retikulozyten mit deren zunehmender Reife abnimmt (193-195). Ribosome finden sich in allen Zellen, die Proteinbiosynthese betreiben. Da im Blut Erythrozyten dominieren, kann davon ausgegangen werden, dass die detektierte ribosomalen Proteine vorwiegend aus Erythrozyten stammen.

Ribosomale Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Ribosomen-Anlagerung und Translation von Proteinen. Daneben haben sie zahlreiche andere Funktionen (216, 217), u.a. in der Entwicklung und

Organogenese von Tieren (216). Der Verlauf ribosomaler Proteine in FG wurde noch nicht beschrieben und zeigte sowohl mit steigendem GA als auch postnatal eine Abnahme. Hinweise, auf Unterschiede in der intra- und extrauterinen Entwicklung ergaben sich keine.

Die veränderte Expression einiger ribosomaler Proteine ist mit schwerwiegenden Erkrankungen im Neugeborenenalter bzw. 1. Lebensjahr assoziiert. Diese gehen mit einer Beeinträchtigung der Erythropoese und kongenitalen Anomalien einher (218-224).

Die ribosomalen Proteine **RPS28**, **RPL15**, **RPS19**, **RPL11** und **RPL18** werden mit der Diamond-Blackfan Anämie assoziiert. Vermutlich wird die Ribosomen-Bildung u.a. durch Genommutationen oder Proteinkürzungen gestört und so das Zellwachstum und die Zellproliferation beeinträchtigt. Dies resultiert in einer abnormen embryonalen Entwicklung, die durch eine gestörte Erythropoese in Kombination mit kraniofazialen Fehlbildungen und kongenitalen Malformationen des Herzens und des Urogenitalen Systems charakterisiert ist (218-221, 224). Mutationen im **RPSA**-Gen sind mit einer kongenitalen isolierten Asplenie assoziiert, was die Bedeutung des Proteins in der Entwicklung der Milz unterstreicht (222). 60S ribosomal protein (**RPL13**) spielt neben seiner Funktion in der Proteinsynthese ebenfalls eine Rolle in der Knochenentwicklung. Neue Spleissvarianten von RPL13 haben eine seltene Knochen dysplasie (Spondyloepimetaphyseale Dysplasie) zu Folge, die zu Kleinwüchsigkeit führt (223).

### 4.2.3 Apolipoproteine

Apolipoproteine sind Bestandteil der Lipoproteine, die den Transport von Triacylglycerinen (TAG) (in Form von Chylomikronen) und Cholesterol (in Form von HDL, LDL und VDL) im Blut ermöglichen. Sie werden vorwiegend in Leber und im Darm synthetisiert und ins Plasma sekretiert (225). Auch die Plazenta als endokrin sekretorisches Gewebe setzt Apolipoproteine, insbesondere ApoA1 und ApoE, ins maternale und fetale Plasma frei und überschreitet sogar die Sekretionsleistung der Leber (226). Apolipoproteine sind für die Lipid-Homeostase zuständig und spiegeln den metabolischen bzw. Lipidstatus eines Individuums wider. Hohe LDL-Konzentrationen und niedrige HDL-Konzentrationen sind stark mit der Entwicklung der Atherosklerose assoziiert (227). Beim Erwachsenen fungieren Apolipoproteine als klassische Marker für ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko und das metabolische Syndrom (228, 229) und zeigten sich in ihrer Aussagekraft gegenüber des LDL/HDL-Quotienten vergleichbar (230). Das kardiovaskuläre Risiko im Erwachsenenalter ist bei ehemaligen FG im Vergleich zu RG erhöht (50). Lipidprofile im Kindesalter korrelieren mit dem kardiovaskulären Risiko im Erwachsenenalter (230). Es besteht die Annahme, dass diese Assoziation ihren Ursprung bereits zum Geburtszeitpunkt hat (231). Das Lipidprofil von Neugeborenen bei Geburt ist abhängig vom GA. LDL- und Cholesterin-Konzentrationen sind im Nabelschnurblut FG höher als bei RG, wohingegen HDL vermindert vorhanden war (231-235). In Korrelation ist eine Verschiebung des Apolipoprotein-Profiles bekannt (147, 170, 171, 233).

Insgesamt waren Apolipoproteine mit antiatherogenen, antioxidativen bzw. protektiven Eigenschaften (**APOA4, APOC1, APOA1**) in FG vermindert und zeigten mit steigendem GA als auch postnatal einen Anstieg. Dies deckte sich mit den Ergebnissen von Suski et al. und früheren Untersuchungen (147, 170, 171, 233). Anhand der Daten konnte allerdings keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Werte von RG zu einem späteren Zeitpunkt erreicht werden. Die genannten Apolipoproteine waren darüber hinaus bei einem kGA von 32 SSW in höheren Konzentrationen vorhanden als bei FG mit Geburt nach 32 bzw. 33 SSW. Dies deutet auf eine schnellere extrauterine Entwicklung hin.

Insbesondere **APOA4** zeigte in der longitudinalen Analyse bereits nach wenigen Lebenstagen einen hochsignifikanten Anstieg. APOA4 ist ein Hauptbestandteil von HDL und Chylomikronen und verhindert die Oxidation von LDL (236). **APOC1** ist ein Bestandteil von VLDL (10%) und HDL (2%). Es verhindert die Bindung von LDL bzw. VLDL an den LDL- bzw. VLDL- Rezeptor und beeinträchtigt so die direkte Aufnahme von Fettsäuren ins Fettgewebe (237). **APOA1** korrelierte positiv mit dem postnatalen Alter. Ergänzend konnte in früheren Studien ein progressiver Anstieg zwischen der 21. und 34. SSW beobachtet werden (232, 238). APOA1 ist ein Hauptbestandteil des HDLs und transportiert Cholesterin aus dem extrahepatischen Gewebe zurück in die Leber (239).

In Abhängigkeit von der Art der Nahrungsaufnahme (Muttermilch oder Pre-Milch) kommt es nach der Geburt zu einem mehr oder weniger starken Anstieg von TAG und Cholesterin (240). Parallel dazu zeigt sich auch eine Veränderung der HDL- und LDL-Zusammensetzung (241, 242). Insbesondere der fetale Darm und weniger die Leber enthalten APOA4-mRNA. Nach Geburt steigt APOA4 demnach aufgrund einer vermehrten intestinalen Produktion an, die zumindest teilweise durch die Nahrungsaufnahme des Neugeborenen bedingt sein könnte (243).

**APOE** nimmt ebenfalls eine protektive Rolle in der Entstehung der Atherosklerose ein. Mit steigendem GA nahm APOE im Gegensatz jedoch ab. Ergänzend konnte Suski et al. postnatal eine fallende Dynamik aufzeigen (170). APOE ist ein Bestandteil von Chylomikronen und VLDL, bindet aber vorzugsweise an HDL (244). Es erleichtert die Aufnahme von Lipoproteinrückständen in die Leber sowie den Efflux von Cholesterin aus Schaumzellen in der Intima atherogener Läsionen. Zusätzlich beeinflusst APOE die Immunantwort beteiligter Makrophagen und T-Lymphozyten (245). Darüber hinaus spielt APOE eine Rolle im Lipidtransport des zentralen Nervensystems und reguliert dort das Überleben und die Aussprossung von Neuronen (246, 247). Insbesondere APOE4 ist bei Erwachsenen mit der Pathogenese von Alzheimer assoziiert (247) und induziert im Erwachsenenalter die Neurogenese im Hippocampus (248, 249). Hinweise, ob APOE auch in der Neugeborenenperiode eine Bedeutung für die Neurogenese spielt, waren in der Literatur bis dato nicht zu finden.

Parallel zu der verminderten Konzentration von antiatherogenen Apolipoproteinen (APOA4, APOC1, APOA1), waren proatherogene Apolipoproteine (**APOC3**) in FG vermehrt angereichert und korrelierten

negativ mit dem GA. In früheren Studien wurden für APOC3 in RG von Werten berichtet, die mit denen Erwachsener vergleichbar waren (147, 148).

**APOC3** korreliert stark positiv mit den TAG-Konzentrationen im Plasma und ist mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert. Es hemmt die Lipoproteinlipase als auch die Aufnahme von TAG-reichen Lipoproteine durch die Leber und kann so zu einer Hypertriglyceridämie beitragen (250). Insbesondere bei FG unter (totaler) parenteraler Ernährung wird oft eine Hypertriglyceridämie beobachtet, die zusätzlich negativ mit dem Geburtsgewicht korreliert (251, 252).

In Kombination mit dem Wissen um ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko von FG im höheren Lebensalter stellt das Profil aus den beschriebenen Apolipoproteinen (APOA4, APOC1, APOA1, APOE und APOC3) einen wichtigen Biomarker-Panel dar.

Die Lipidfraktion von Plasma hat zusätzlich einen wichtigen immunsuppressiven Effekt (111). Serum-Lipoproteine verhindern eine proinflammatorische Immunantwort auf Endotoxine, bakterielle Lipopeptide, Viren und sogar Parasiten (111). V.a. ExtFG leiden zu einem Großteil an Infektionen und müssen vor einer überschießenden Immunantwort geschützt werden. Im Rahmen von Infektionen konnte eine Zu- bzw. Abnahme der Apolipoproteine bei Neugeborenen beobachtet werden (253-255). **APOA1** z.B. reduziert die Chemotaxis und Adhäsion von Leukozyten (256). **APOC1** stimuliert die Immunantwort auf Lipopolysaccharide und reduziert die Mortalität in gram-negativer Sepsis (257). Bei FG konnte für die genannten Apolipoproteine **APOA1** und **APOC1** postnatal ein Anstieg beobachtet werden. Dies könnte eine physiologische Reaktion auf die Exposition mit der antigenreichen Umwelt darstellen. Interessanterweise war zusätzlich ein Anstieg über das GA zu beobachten. Intrauterin besteht eine weitgehend sterile Umgebung, weshalb der Schutz gegenüber einer überschießenden Immunantwort noch nicht benötigt wird. Der Anstieg der Apolipoproteine mit steigendem GA könnte als Vorbereitung auf das extrauterine Leben interpretiert werden.

#### **4.2.4 Blutgerinnung**

Im Hinblick auf die Gerinnungs- und Blutungskomplikationen bei FG wurde die GA-abhängige und postnatale Entwicklung der Thrombozyten (primäre Hämostase) und Gerinnungsfaktoren (sekundäre Hämostase) bereits umfangreich untersucht (95, 98). Unsere Daten korrelierten mit bisherigen Studien (95, 98, 99, 258, 259) und zeigten einen Anstieg der Thrombozyten-Proteine und Gerinnungsfaktoren mit steigendem Gestations- und Lebensalter im Sinne einer fetalen entwicklungsbedingten Regulation des Gerinnungssystems.

## Thrombozytäre Proteine

Die Thrombozytenzahl nimmt mit steigendem GA um ca.  $2 \times 10^9/L$  pro Woche zu. Gleichzeitig fällt eine maßgeblich entwicklungsbezogene, verminderte Thrombozytenfunktion auf. Diese ist in FG stärker ausgeprägt als in RG (258, 260).

Im Rahmen einer Gewebeschädigung binden die Oberflächenproteine Platelet glycoprotein Ib alpha und beta (GP1BA und GP1BB) an vWF und die Thrombozyten durchlaufen eine Konformationsänderung. Die Thrombozyten werden aktiviert und über den GPIIb/IIIa-Rezeptor und Fibrinogen die Thrombozytenaggregation ermöglicht (261). In unseren Daten konnte sowohl ein Anstieg von **GP1BA** und **GP1BB** mit steigendem GA als auch von Integrin alpha IIb (**ITGA2B**, Bestandteil des Glykoprotein-Rezeptors) und Integrin beta-3 (**ITGB3**) mit steigendem postnatalem Alter gezeigt werden. ITGA2B und ITGB3 bilden gemeinsamen den GPIIb/IIIa-Rezeptor (Integrin alpha-IIb/beta-3) für Fibrinogen, Fibronektin, Thrombospondin und Vitronektin. Durch die Bindung von löslichem Fibrinogen wird die Plättcheninteraktion ermöglicht (262). Die adhäsiven Glykoproteine **Fibronektin** (FN1) und **Thrombospondin** (THBS1) nahmen ebenfalls mit steigendem GA zu. Dies ist nicht nur durch die verminderte Thrombozytenzahl, sondern auch durch eine verminderte Expression der thrombozytären Oberflächenproteine bedingt (259).

Die neonatale Thrombozytenfunktion normalisiert sich bereits nach 10-14 Tagen für RG und FG (258). Ontogenetisch könnten die Unterschiede in der Thrombozytenfunktion eine wichtige Anpassung für die Geburt und das frühe postnatale Leben darstellen, um eine übermäßige Thrombozytenaktivierung und Thrombosebildung im Rahmen der Gewebeschädigung zu vermeiden (258).

Die Proteine Alpha-actinin-1 (**ACTN1**), Talin-1 (**TLN1**) und Filamin-A (**FLNA**) sind u.a. im Zytoskelett von Thrombozyten enthalten (263, 264) und spiegelt sowohl den Anstieg der Thrombozytenzahl- als auch reife wider (259). **TLN1** ist ein Integrin-Adaptor-Molekül, das essenziell für die Aktivierung des Integrin-Rezeptors auf Thrombozyten ist (265). Die Daten decken sich mit dem fetalen Mausmodell, in dem sich ebenfalls eine verminderte Expression von u.a. TLN1 zeigte (259).

## Fibrinogen

Die Fibrinmonomere Fibrinogen alpha, beta und gamma (**FGA, FGB, FGG**) werden als letzter Schritt der Gerinnungskaskade proteolytisch gespalten und bilden eine feste Fibrinmatrix. Zusätzlich verstärkt Fibrinogen im Mausmodell die Expression von P-Selectin (SELP) in aktivierten Thrombozyten über eine ITGB3-abhängige Signalkaskade (266). Das thrombozytäre SELP spielt eine wichtige Rolle in der Thrombozytenaggregation und mediiert durch die Interaktion mit PSGL-1 (Ligand für P-Sel auf Leukozyten) die Entstehung einer Immunthrombose (267). Sowohl für **Fibrinogen** als auch Integrin beta-3 (**ITGB3**) konnte ein Anstieg über beide Zeitachsen (FGA, FGB, FGG) bzw. postnatal (ITGB3) beobachtet werden. Fibrinogen zeigte in früheren Studien keine GA-abhängige Entwicklung (98), was

jedoch auf die Methodik der Studien zurückzuführen ist. Suski et al. konnte ebenfalls eine verminderte Intensität in FG und einen postnatalen Anstieg vermerken (170, 171). Neben der Blutgerinnung spielt Fibrinogen auch in der angeborenen und T-Zell-vermittelten Immunantwort eine Rolle, was das Zusammenspiel bzw. Wechselwirkung zwischen Gerinnung und Immunsystem verdeutlicht (268-270). Eine veränderte Expression von Fibrinogen bzw. eines Fibrinmonomers wurde in verschiedenen Studien als möglicher Biomarker für verschiedenste Pathologien wie z.B. die Gestationsdiabetes induzierte Makrosomie (271) oder den PDA (zusammen mit Fibronectin) (161) vorgeschlagen. Es konnte gezeigt werden, dass der Verschluss eines PDAs in RG mit der Bildung eines stabilen Thrombus assoziiert ist. Insbesondere Thrombozyten spielen durch die Förderung des thrombotischen Verschlusses und die luminale Remodellierung eine entscheidende Rolle (272).

### **Gerinnungsfaktoren**

Gerinnungsfaktoren werden nicht transplazentar von der Mutter auf das Kind übertragen. In der 5. SSW beginnt die fetale Leber mit der Produktion (273). Dementsprechend weisen FG geringere Konzentrationen auf als RG (95, 98, 99, 258, 274, 275). Die Anpassung der Konzentrationen erfolgt für FG schneller als für RG, was wir in unserem Datensatz bestätigen konnten. Ca. 6 Monaten postnatal haben RG und FG vergleichbare Werte erreicht, die größtenteils denen Erwachsener entsprechen (95, 98). Zusätzlich zu dem Anstieg von Fibrinogen und Faktor XIII in unserem Datensatz konnte Suski et al. die Dynamik weiterer Gerinnungsfaktoren aufzeigen (170, 171).

Unsere Daten bestätigen eine ontogenetische Regulierung der thrombozytären Proteine (und damit Thrombozytenfunktion) sowie der Gerinnungskaskade. Klinisch kann eine ca. doppelt so lange Blutungszeit bei FG mit einem GA < 33 Wochen im Vergleich zu RG beobachtet werden (276). Neben den gezeigten Unterschieden der Thrombozytenzahl- und funktion sowie der Gerinnungsfaktoren beeinflussen u.a. eine geringere Erythrozytenanzahl als auch eine veränderte Endothelfunktion die Gerinnung entscheidend (277).

Im Rahmen einer Frühgeburtlichkeit und der damit verbundenen Exposition gegenüber der extrauterinen Umwelt kann eine ontogenetische Regulation im Sinne einer höheren Inzidenz an Blutungskomplikationen problematisch werden. Die intraventrikuläre Hämorrhagie ist eines der Hauptkomplikationen in FG und korreliert umgekehrt proportional mit dem GA (278). Unsere Daten zeigen, dass kompensatorisch sowohl thrombozytäre Proteine als auch Gerinnungsfaktoren extrauterin schneller ansteigen.

### **Antikoagulatorische Faktoren**

Das resultierende erhöhte Blutungsrisiko wird durch eine verminderte Konzentration der antikoagulatorischen Faktoren (Antithrombin, Protein C und S, sowie Heparin-Kofaktor II, Alpha-2-Makroglobulin),

einem erhöhten Hämatokrit und MCV ausgeglichen. Die Werte Erwachsener werden nach ca. 3 Monaten erreicht (258, 279). Dies spiegelte sich in unserem Datensatz durch den Anstieg von Antithrombin-III (**AT-III**, **SERPINC1**) über das GA und Alpha-2-Makroglobulin (**A2M**) über beide Zeitachsen wider. Studien zeigen, dass die absoluten Konzentrationen von A2M bereits bei Geburt die Werte Erwachsener übersteigen (273). AT-III besitzt die größte antikoagulatorische Wirkung in Erwachsenen. Die geringe postnatale AT-III Konzentration in der Neugeborenenperiode wird durch A2M durch die Bindung von alpha-Thrombin ausgeglichen (280). Dies könnte die geringere Inzidenz von Thrombosen in Neugeborenen trotz der geringeren AT-III-Konzentrationen erklären (280). A2M ist ein Glykoprotein und fungiert als „molekulare Falle“ für aktivierte Proteinase (u.a. Gerinnungsfaktoren). Diese werden von ihren Substraten getrennt und dann degradiert (281). Die A2M-Synthese wird durch proinflammatorische Zytokine reguliert, sodass A2M bei akuten oder chronischen inflammatorischen Erkrankungen, wie z.B. Sepsis, dem Nephrotischen Syndrom oder Diabetes Mellitus, vermehrt exprimiert wird (282).

Auch wenn sich das Gerinnungssystem von Neugeborenen stark von dem Erwachsener unterscheidet, sind pro- und antikoagulatorische Faktoren gleichermaßen reduziert vorhanden, sodass ein homöostatisches Gleichgewicht besteht. Das Gerinnungssystem von FG ist keineswegs unreif, sondern vielmehr den intrauterinen Begebenheiten des sich entwickelnden Organismus angepasst (258, 273).

#### **4.2.5 Immunsystem**

Insbesondere ExtFG leiden vermehrt an Infektionen (23). Die Untersuchung des Immunsystems auf Zellebene zeigte bereits signifikante Unterschiede zwischen RG und FG sowie eine stereotype Entwicklung sowohl der Anzahl als auch des Phänotyps der meisten Zellen entlang des GA und postnatal (101, 113-116). Insbesondere das Komplementsystem wurde schon umfangreich untersucht. Mit dem Immunsystem assoziierte Proteine wurden hingegen nur vereinzelt beschrieben.

##### **Komplementsystem**

Das Komplementsystem setzt sich aus mehreren Proteinen, den sog. Komplementfaktoren C1-C9, zusammen. Diese aktivieren sich gegenseitig kaskadenartig und bilden schließlich den MAC (membrane attack complex) (103, 283). Die biologische Aktivität des Komplement- und Gerinnungssystems wird über spezifische „Regulatoren“ (u.a. C1s-Inhibitor, C3b-Inaktivator, Anaphylaxin-Inaktivator) kontrolliert (283). Die Aktivierung des Komplementsystems kann über drei verschiedene Pfade erfolgen. Der Lektin-Weg wird durch das Mannose-bindende Lektin (MBL) induziert, welches das Kohlenhydrat (Mannose)-Profil auf Pathogenen erkennt und die MBL-assoziierten Serinproteasen aktiviert. Der klassische Weg im Gegensatz dazu arbeitet über die Bindung eines Antikörpers an ein Antigen (Ag-Ak-Komplex), der durch C1q erkannt wird. C1r und C1s lagern sich an den Komplex an und die Serinproteasen werden aktiviert. Der klassische und Lektin-Weg setzen über eine gemeinsame Strecke (C4 und

C2) C3 und damit die Komplementkaskade in Gang. Beim alternativen Weg kommt es zu einer spontanen Hydrolyse von C3 in C3a und C3b. C3b bindet an die Membran des Pathogens. Durch die Anlagerung weiterer Faktoren wird die C3-Konvertase gebildet, die die Komplementkaskade aktiviert (284).

Der Anstieg der Komplementfaktoren über das GA und postnatal ist bereits umfangreich untersucht und konnte auch in unserem Datensatz beobachtet werden. Zusätzlich zeigte sich parallel zum Gerinnungssystem eine schnellere extrauterine Reifung, im Sinne eines schnelleren Konzentrationsanstiegs. Eine mögliche Erklärung könnte die Anpassung an die antigenreiche Umwelt sein.

Komplementfaktoren werden im Gegensatz zu Antikörpern nicht transplazentar von der Mutter auf den Fetus übertragen (105), sondern ab der 20. SSW intrauterin in der Leber produziert (101). Bis zum dritten Trimester bleibt die Konzentration niedrig (105). Erst zum Ende der Schwangerschaft kommt es zu einem schnellen Anstieg der Serumkonzentrationen (101, 105). Das Komplementsystem gesunder RG ist bei Geburt unterentwickelt (ca. 60% der Werte Erwachsener) und gleicht sich nach ca. 3 Lebensmonaten an die Werte Erwachsener an. Diese Defizite sind bei FG noch stärker ausgeprägt. Zusammengefasst ist Lysefähigkeit von Bakterien und die Chemotaxis von Leukozyten reduziert sowie die Fähigkeit des Komplementsystems, die Phagozytose mittels Opsonierung zu verbessern, vermindert. Dies resultiert in einer erhöhten Anfälligkeit von Neugeborenen und insbesondere FG gegenüber Infektionen (24, 101, 105, 285).

Anhand des Datensatzes konnten wir insbesondere die Dynamik der Komplementfaktoren des klassischen Wegs (**C1q A und B, C1s, C1r**) inklusive der gemeinsamen Strecke des Lektinwegs (**C2, C4**) und des gemeinsamen Endwegs (**C5, C6, C9**) betrachten. Die genannten Proteine zeigten eine Zunahme über mind. 1 der beiden Zeitachsen. Im Gegensatz blieb C7 über das GA und postnatal konstant. In früheren Studien konnte für C7 in RG bereits bei Geburt mit Erwachsenen vergleichbare Werte gefunden werden (173). Die Proteine des Lektin- und alternativen Wegs waren nicht signifikant verändert. Ergänzend konnten Bennike et al. in RG eine postnatale Abnahme der Proteine des Lektin-Wegs (FCN-2, FCN-3, MASP1) und ein ambivalentes Verhalten der Komplementfaktoren des alternativen Wegs (Properdin (CFP), CFB) beobachten (173).

Auch die Inhibitoren des Komplementsystems waren in FG vermindert (**C4BPA**) und zeigten postnatal eine Zunahme (**C4BPA, SERPING1**). In RG konnte im Gegensatz dazu eine fallende Dynamik innerhalb der ersten Lebenswoche beobachtet werden (173). Die Proteine C4b-binding protein alpha chain (**C4BPA**) und Plasma protease C1 inhibitor (**SERPING1**) regulieren die Komplementaktivierung über den klassischen Weg (173). C4BPA bindet als Kofaktor an den C3b/C4b- Inaktivator, der im Folgenden C4b hydrolysiert. SERPING1 dagegen vermindert die Aktivität von C1s, C1r, Kallikrein und Faktor VII (286). Sowohl C4BPA als auch SERPING1 können ebenfalls die Gerinnung beeinflussen (286).

## Inflammatorische Proteine

Proteine, die eine wichtige Rolle in der Regulation inflammatorischer Prozesse und der Immunantwort spielen, nahmen i.d.R. über mind. eine der beiden Zeitachsen zu. Neben den bereits von Suski et al. beschriebenen Proteinen Orosmuroid 1 und 2 (ORM1 und ORM2) (170, 171) konnten wir erstmals die Dynamik weiterer inflammatorischer Proteine aufzeigen. Das erhöhte Infektionsrisiko von Neugeborenen wird der Unreife des neonatalen Immunsystems zugeschrieben. Dabei wird insbesondere die im Vergleich zu Erwachsenen verminderte Antwort von neonatalen Immunzellen auf mikrobielle Stimuli betont.

Parallel zu Suski et al. nahmen die Proteine **ORM1 und ORM2** auch in unserem Datensatz über das GA und postnatal zu (170, 171). Die Proteine steigen während einer Akute-Phase-Reaktion um ein Vielfaches an (287) und besitzen wichtige immunmodulatorische Eigenschaften. Sie hemmen u.a. die Migration von Neutrophilen (288), die Lymphozyten-Proliferation (289) und die Aktivierung von Makrophagen (290). Gleichzeitig beeinflussen ORM1 und 2 jedoch auch die Produktion der Zytokine IL-1 beta, IL-6 und TNF-alpha positiv (291, 292). Diese verschiedenen, z.T. gegensätzlichen biologischen Funktionen sind durch das unterschiedliche Glykosylierungs-Muster von ORM bedingt (287, 293).

Die Proteine **S100A8 und S100A9** binden Calcium und Zink und sind überwiegend als Calprotectin (S100A8/A9) anzutreffen (294). Beide Proteine zeigten eine positive Dynamik über das GA. Calprotectin wird von Neutrophilen im Rahmen einer Inflammation freigesetzt und wirkt proinflammatorisch, antimikrobiell, antioxidativ und Apoptose-induzierend (295, 296). Die Proteine induzieren u.a. die Chemotaxis und Adhäsion von Neutrophilen, erhöhen die Phagozytose-Eigenschaften und induzieren die Degranulation von Neutrophilen (297, 298). Während die Protein-Intensität von S100A8/A9 in FG im Vergleich zu RG vermindert war, zeigte sich die Genexpression bei Monozyten in FG erhöht (299). Im Mausmodell zeigte sich eine starke Vermehrung von immunregulierenden Monozyten in S100A9<sup>-/-</sup> Feten im Vergleich zum Wildtyp. Die Vermehrung dieser Monozyten korrelierte jedoch nicht mit S100A8/A9-Konzentrationen im Nabelschnurblut. Funktionell sind verminderte S100A8/A9-Intensitäten mit einer hyperinflammatorischen Immunantwort und Sepsis assoziiert. Zusammengefasst scheint S100A8/A9 eine regulierende Funktion für das neonatale Immunsystem zu spielen, in dem es die Vermehrung inflammatorischer Monozyten verhindert und somit wiederum die T-Zell-Proliferation unterdrückt (300).

Annexin 1 (**ANXA1**) stieg mit zunehmendem GA an und war signifikant in RG angereichert. ANXA1 wirkt im Rahmen der angeborenen Immunantwort antiinflammatorisch und ist eines der Mediatoren der antiinflammatorischen Wirkung von Glucocorticoiden (301, 302). Das Protein wird in hohen Konzentrationen von Neutrophilen und Makrophagen exprimiert. Es vermindert die Leukozyteninfiltration des

Gewebes und aktiviert die Apoptose von Neutrophilen. Zusätzlich fördert ANXA1 die Rekrutierung von Monozyten und die Phagozytose abgestorbener Leukozyten (303). In der Literatur gibt es sogar Hinweise, dass ANXA1 eine Rolle in der Umprogrammierung von Makrophagen im Sinne einer verminderten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen spielt (303) und die Differenzierung und Proliferation aktivierter T-Zellen reguliert. Es verstärkt die Differenzierung in T<sub>H</sub>1-Zellen und vermindert die Differenzierung in T<sub>H</sub>2-Zellen (304). Intrauterin ist die Differenzierung von T<sub>H</sub>1-Zellen runterreguliert, um eine fetomaternalen Toleranz zu ermöglichen (24). Niedrige ANXA1-Spiegel in ExtFG spiegeln folglich die physiologische Anpassung auf die intrauterine Umgebung zur Aufrechterhaltung der fetomaternalen Toleranz wider und erklären gleichzeitig die erhöhte Infektanfälligkeit von FG.

Die Matrix metalloproteinase-9 (**MMP9**) korrelierte positiv mit dem GA. Das Protein spielt eine entscheidende Rolle in der lokalen Proteolyse der Extrazellulärmatrix und fördert dadurch die Leukozytenmigration (305, 306). Es wird von alveolären Makrophagen und Granulozyten produziert und konnte auf Proteinebene auf Neutrophilen detektiert werden (307). Im Tiermodell waren MMP9-defiziente Mäuse resistenter gegen Endotoxine, was seine Rolle in der Pathogenese von Sepsis vermuten lässt (308). Darüber hinaus scheinen Metalloproteinasen, u.a. MMP9, einen wichtigen Einfluss in der neurologischen Entwicklung, u.a. im Axonwachstum und der neuromuskulären Synaptogenese, zu haben (309, 310).

Zusätzlich zirkuliert eine Vielzahl von antimikrobiellen Peptiden bzw. Proteinen im Blut, die von Zellen des angeborenen Immunsystems (Granulozyten, Makrophagen, NK-Zellen) nach Antigenkontakt aus deren Granula freigesetzt werden (112, 311-317). Die Zellen von FG unterscheiden sich von RG nicht nur in ihrer verminderten Anzahl, sondern auch durch die reduzierte Zytotoxizität, infolge weniger zytoplasmatischer Granula und der geringeren Degranulationsfähigkeit (101, 115, 116). In Kongruenz waren die folgenden Proteine in FG vermindert und korrelierten mit dem GA. Dieser Sachverhalt wird durch frühere Studien bestätigt (318). Daraus resultiert eine erhöhte Infektanfälligkeit der FG. Für die Serin-Protease Cathepsin G (CTSG) konnte zusätzlich postnatal eine abnehmende Dynamik festgestellt werden.

Die Proteine Lysozym (**LYZ**), Lactoferrin (**LTF**), Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (**LCN2**), Cathelicidin antimicrobial peptide (**CAMP**) und Serin-Protease Cathepsin G (**CTSG**) wirken durch eine Spaltung oder Bindung von Lipopolysacchariden (LYZ, LTF, CAMP, CTSG) bzw. die Bindung von Eisen (LTF, LCN2) antibakteriell (103, 312, 314, 319-323). **LTF** ist in der menschlichen Milch enthalten. Durch die orale Gabe von bovinem Lactoferrin konnte das Auftreten einer Sepsis und NEC in FG reduziert werden (322). Insbesondere im Rahmen von Stress, Sepsis oder in FG ist die Konzentration der Myeloperoxidase (**MPO**) gering, wodurch die Freisetzung von aggressiv-lytischen Sauerstoffradikalen durch Neutrophile und Makrophagen vermindert ist (315). Leukocyte elastase inhibitor (**SERPINB1**) im Ge-

gensatz dazu ist ein Neutrophil-Serin-Protease-Inhibitor und schützt die Zelle vor Proteasen, die im Rahmen von Stress oder Infektionen ins Zytoplasma ausgeschüttet werden (316).

Die GTPase ADP-ribosylation factor-like protein 8B (**ARL8B**) spielt u.a. eine wichtige Rolle für die Zytotoxizität von NK-Zellen und die MHC-II-Antigen-Präsentation. ARL8B organisiert den Transport von u.a. Antigenen zu den Lysosomen und deren Fusion (324-326) und sorgt speziell in NK-Zellen für die Granula-Exozytose (327). Interessanterweise zeigte ARL8B eine sinkende Dynamik über das GA im Gegensatz zu den im Blut vermehrt zu findenden Granulainhalten.

In Zusammenschau ist das intrauterine Immunsystem an die Bedürfnisse des Fetus angepasst. Dies zeigt sich u.a. in der Verhinderung einer potentiell schädlichen  $T_H1$ -Polarisierung und der Aufrechterhaltung der fetomaternalen Toleranz (z.B. verminderte ANXA1-Intensität). Störungen dieser Gleichgewichts können zu einem Abort oder zur Frühgeburtlichkeit führen. Gleichzeitig wird das Immunsystem im Rahmen einer Frühgeburtlichkeit plötzlich mit einer pathogenreichen extrauterinen Umgebung konfrontiert, auf die es jedoch nicht vorbereitet bzw. ausgerichtet ist. Ein höheres Infektionsrisiko infolge verminderter Abwehrmechanismen (u.a. Komplementsystem, Granulat-Inhalte) ist die Folge.

Ribosomale Proteine, Apolipoproteine, Proteine der Gerinnungs- und Komplementkaskade und Proteine des Immunsystems folgen einer GA-abhängigen Entwicklung, die sich postnatal in einer extrauterinen Umgebung fortsetzt. Mit Ausnahme einzelner Proteine bestätigen unsere Daten frühere Ergebnisse (170, 171, 174). Insgesamt konnten eine Abnahme der ribosomalen Proteine, sowie ein Anstieg der Proteine des Gerinnungs- und Immunsystems über beide Zeitachsen beobachtet werden. Wir konnten zusätzlich aufzeigen, dass die Entwicklung der Proteine extrauterin z.T. sogar schneller verläuft. Dementsprechend können diese Proteine mit einer Reifung der FG assoziiert werden. Auch in RG findet postnatal eine parallel verlaufende Entwicklung statt (173). Der Unterschied zwischen FG und RG scheint v.a. die geringere bzw. höhere Ausgangskonzentration der Proteine zu sein.

### **Immunglobuline (Antikörper)**

Immunglobuline sind heterodimere Glykoproteine, die aus 2 schweren (H= heavy chain) und 2 leichten Peptidketten (L= light chain) aufgebaut und durch Disulfidbrücken verbunden sind (328). Man unterscheidet 5 Isotypen (IgG, IgM, IgD, IgA und IgE), die durch die schwere Peptidkette charakterisiert werden. Antikörper vom IgG-Typ sind plazentagängig und können in 4 Subklassen unterteilt werden (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) (102, 328). IgG1 ist die am effektivsten transportierte Antikörper-Subklasse, IgG2 die am wenigsten (329). Bei Neugeborenen dominiert die Produktion von IgG1 und IgG3, die Produktion von IgG2 und IgG4 fehlt im Gegensatz zu Erwachsenen (105). Die Produktion von IgG1 wird primär durch lösliche Proteinantigene induziert, IgG2 durch bakterielle Lipopolysaccharide, IgG3 durch virale

Antigene (ähnlich IgG1) und induziert selber proinflammatorische Reaktionen, und IgG4 durch wiederholte Exposition gegenüber nicht-infektiösen Antigenen (330).

Unsere Daten zeigten parallel zu Suski et al. (170, 171) einen Anstieg der Immunglobuline mit steigendem GA sowie eine Abnahme im longitudinalen Verlauf. Transplazentar übertragene Antikörper (IgG) sorgen für einen frühen Infektionsschutz des Neugeborenen (109, 113). Der transplazentare Antikörpertransfer beginnt nach dem ersten Trimester und nimmt v.a. ab der 28. SSW mit steigendem GA zu (109, 113). Nach 17 bis 22 SSW lagen die fetalen Antikörper-Konzentrationen bei 5-10% der Mütter und erreichten nach 28 bis 32 SSW schon 50% der maternalen Konzentration. Der Großteil der Antikörper wird jedoch erst in den letzten 4 SSW übertragen und kann bei Geburt die maternalen Konzentrationen sogar um 20-30% übersteigen (331). Der transplazentare Antikörpertransfer korreliert nicht nur mit dem GA, sondern wird darüber hinaus von der maternalen Immunglobulin-Konzentration und dem Antigen-Typ beeinflusst (109, 113, 332). Nach der Geburt sinkt die neonatale Immunglobulin-Konzentration (IgG) bei einer Halbwertszeit von 21-30 Tagen allmählich ab (117). Das Neugeborene beginnt erst nach der Geburt durch den Kontakt mit der antigenreichen Umwelt mit einer endogenen Antikörpersynthese (105). Bennike et al. konnte bereits ab dem 1. Lebenstag mRNA-Transkripte von IgG1-Antikörpern im Blut von RG feststellen, was auf eine endogene Synthese hinweist (173). Diese ist jedoch in Abhängigkeit des Antigens für die ersten 12 bis 24 Monate vermindert. Die Kapazität zur Produktion von Gedächtniszellen ist reduziert und die Affinitätsreifung von Gedächtniszellen bis zu einem Alter von 4-6 Monaten eingeschränkt (117). Beim Vergleich der intrauterinen (GA) und postnatalen Entwicklung (kGA), waren Immunglobuline bei Geburt nach 32 bzw. 33 SSW vermehrt angereichert. Dementsprechend fällt die neonatale Antikörpersynthese hinter dem transplazentaren Transfer zurück, was die erhöhte Infektionsanfälligkeit von FG mit sinkendem GA z.T. erklären kann. Transplazentar übertragene Antikörper korrelieren indirekt proportional mit dem Risiko einer neonatalen B-Streptokokken-Sepsis (333, 334). Die IgG-Konzentration von Erwachsenen wird i.d.R. in einem Alter von 4 bis 6 Jahren erreicht (335). Durch die parallele Analyse von Protein- und mRNA-Konzentrationen konnte Bennike et al. die postnatale Dynamik der Immunglobuline bei RG innerhalb der ersten Lebenswoche bestätigen (173).

#### **4.2.6 Organogenese**

Während die Entwicklung des Herzes bis zum 1. Trimester weitgehend abgeschlossen ist, findet insbesondere die Reifung von Gehirn, Lunge und Niere noch bis zur 40. SSW statt (22, 77, 84). Unter der Annahme, dass mit der Organogenese assoziierte Proteine aus dem jeweiligen Gewebe ins Blut freigesetzt werden, konnten Proteinmuster für die Organentwicklung identifiziert werden. Mutationen der im folgenden beschriebenen Proteine wurden bereits mit seltenen syndromalen Erkrankungen in Zu-

sammenhang gebracht oder im Tiermodell eine Rolle in der Organogenese vermutet. Wir konnten erstmalig die Dynamik über das GA und postnatal in FG beschreiben. Der genaue Mechanismus bzw. Funktion der Proteine ist meist nicht bekannt. Insgesamt zeigte sich keines der genannten Proteine im Vergleich hochsignifikant verändert. Dies unterstreicht nochmals die Bedeutung der MS, die bereits kleinste Intensitätsveränderungen detektieren kann und gleichzeitig eine globale Analyse des physiologischen Zustands ermöglicht. Neben den bereits beschriebenen Proteinen (ribosomale Proteine, TFRC, MMP9) konnten weitere Proteine gefunden werden, die eine Rolle in der zerebralen bzw. neurologischen, kardialen, renalen und pulmonalen Entwicklung spielen.

### Gehirn

Die Proteine Transferrin receptor protein 1 (**TFRC**), **MMP9** und Myosin-10 (**MYH10**) sind mit der Entwicklung des *Gehirns* assoziiert (336, 337). **TFRC** korrelierte negativ mit dem GA und nahm postnatal zusammen mit FLNA zu. **MYH10** zeigte sowohl über das GA als auch postnatal eine signifikante Abnahme.

Mutationen der Gene V-type proton ATPase catalytic subunit A (**ATP6V1A**), AP-2 complex subunit mu (**AP2M1**) und Clathrin heavy chain 1 (**CLTC**) haben eine epileptische Encephalopathie (DEE) zur Folge (337-339). Für alle drei Proteine konnte mit steigendem Gestations- und postnatalem Alter eine fallende Dynamik beobachtet werden. DEEs sind eine heterogene Gruppe von schwerwiegenden Epilepsien, die durch meist Therapie-resistente Krampfanfälle in Kombination mit signifikanten Entwicklungsdefiziten charakterisiert sind (340). Klinisch stehen in Abhängigkeit des betroffenen Proteins verschiedene zusätzliche Pathologien im Vordergrund. Für **ATP6V1A** wird eine Funktion in der Neuritenentwicklung und Synapsenbildung vermutet (337). **AP2M1** wird im Gehirn exprimiert und ist ein Bestandteil des Adaptor Proteinkomplexes 2 (AP-2), das in der Clathrin-medierten Endozytose und dem Vesikel-Recycling an der Synapse beteiligt ist (341, 342). Auch für **CLTC** konnte eine wichtige Funktion für das Vesikel-Recycling im Gehirn und der Freisetzung von Neurotransmittern an der präsynaptischen Membran nachgewiesen werden (343).

Neben **MYH10** (siehe unten) werden die Proteine Dystonin (**DST**), Serine—tRNA ligase, cytoplasmic (**SARS**) und Casein kinase II subunit alpha (**CSNK2A1**) mit der neurologischen Entwicklung assoziiert. Diese Proteine zeigten ebenfalls über beide Zeitachsen eine (signifikante) Abnahme. Mutationen der codierenden Gene haben eine mentale Retardierung und motorische Entwicklungsdefizite zur Folge (344, 345). Mutationen im **DST**-Gen führen zusätzlich zu einer neonatalen Hypotonie, respiratorischen Beeinträchtigungen und einer gestörten kardiovaskulären Funktion (344). **DST** ist ein wichtiges Verbindungsprotein des Zytoskeletts und ermöglicht den retrograden axonalen Transport (346). **SARS** spielt eine Rolle in der tRNA-Aminoacylation und ist somit wichtig für die funktionelle Integrität der tRNA. Diese scheint wichtig für die neurologische Entwicklung zu sein (345). **CSNK2A1** ist ein Bestandteil er

Protein kinase CK2, die ihre Substrate durch Phosphorylierung reguliert (347). Es wird angenommen, dass jede Untereinheit der Kinase eine zusätzliche Funktion im jeweiligen spezifischen Gewebe besitzt. CSNK2A1 wird in hohen Konzentrationen im Gehirn exprimiert, was eine Rolle in der Hirnentwicklung bzw. -funktion vermuten lässt (348).

Ankyrin-2 (**ANK2**) wird sowohl im fetalen Gehirn als auch im Temporallappen bei Erwachsenen exprimiert (349) und zeigte eine signifikante Zunahme über das GA. Subplate-Neurone sind eines der ersten generierten Neurone der Hirnrinde und exprimieren bei Katzen u.a. Fibronectin (**FN1**) (60, 350). FN1 war über das GA relativ stabil und nahm postnatal signifikant zu. Dementsprechend zeigte sich im Vergleich der intra- und extrauterinen Entwicklung postnatal höhere Werte für FN1.

### Herz

Die Proteine **ANK2**, **FLNA**, **TKT** und **MYH10** werden gleichzeitig mit der Entwicklung des *Herzens* in Zusammenhang gebracht. Klinisch konnte eine erhöhte Inzidenz von extrakardialen Anomalien (v.a. des Gehirns und des urogenitalen Systems) bei Neugeborenen mit angeborenen Herzfehlern beobachtet werden (88). Bei Feten mit einer kongenitalen Herzerkrankung zeigte das Gehirn eine verminderte Reifung (u.a. Synaptogenese) während des dritten Trimesters (89, 90). Während ANK2 und Filamin-A (**FLNA**) über beide Zeitachsen zunahmen, fiel MYH10 signifikant ab. Transketolase (**TKT**) nahm über das GA signifikant zu und zeigte postnatal eine eher fallende Dynamik.

**ANK2** spielt eine Rolle in der Lokalisation und Membranstabilisierung von Ionenkanälen- und -transportern u.a. in Kardiomyozyten. Es wird für die Expression einer Spectrin-Kette (SPTBN1) in neonatalen Herzmuskelzellen und der Regulation der Kontraktionsfrequenz benötigt (351). Filamin-A (**FLNA**) fördert die Verzweigung von Aktin-Filamenten und verankert Transmembranproteine mit dem Zytoskelett. Im Mausmodell spielt FLNA eine Rolle im Zell-Zell-Kontakt und den Adhärenz-Junktionen während der Entwicklung von Blutgefäßen, des Herzens und des Gehirns. Durch Mutationen im menschlichen FLNA-Gen wird die Migration der Neuronen zur Hirnrinde unterbrochen und es entstehen kardiovaskuläre Defekte (352).

Mutationen von **TKT** und **MYH10** sind jeweils mit entwicklungsneurologischen Defiziten als auch kongenitalen Herzerkrankungen (VSD, ASD, PFO) assoziiert (353-356). Neugeborene mit Mutation des Myosin10-Gens (**MYH10**) litten an einer intrauterinen Wachstumsretardierung, Mikrokephalie, entwicklungsneurologischen Defiziten, einer zerebellaren Atrophie und einer kongenitalen Diaphragma-Hernie. Im Tiermodell starben MYH-10 Knock-out-Mäusen nach 14,5 Lebenstagen aufgrund von neurologischen Fehlbildungen (Hydrocephalus und abnorme Neuronenmigration) und strukturellen Herzdefekten (membranöser VSD, Fehlbildungen des Ausflusstrakts) (357). MYH10 ist essenziell für die Zellteilung von Kardiomyozyten und spielt eine Rolle in der Entwicklung der Koronargefäße (358).

Daneben konnten zwei weitere Proteine (**HSPG2** und **POSTN**) für die Herzentwicklung identifiziert werden, die eine fallende Tendenz über beide Zeitachsen zeigten. Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein (**HSPG2**) ist ein Bestandteil der Basalmembran, des Knorpels und verschiedener mesenchymaler Gewebe. Bei HSPG2-defizienten Mäusen konnte eine mechanische Instabilität des Herzmuskels der embryonalen Maus beobachtet werden (359). Periostin (**POSTN**) trägt durch die Expression auf kardialen Fibroblasten zur postnatalen Herzmuskelzellreifung und der kardialen Innervation bei (360). Zusätzlich wird im Mausmodell über die Rolle von POSTN in der Nierenentwicklung diskutiert (361).

### Niere

Ein Großteil der Nephrogenese findet im dritten Trimester statt. Durch eine Frühgeburtlichkeit wird diese unterbrochen und findet z.T. postnatal weiter statt (77-79). Neben POSTN konnten 4 weitere Proteine identifiziert werden, die in der *Nierenentwicklung* eine Rolle spielen.

Die Niere entwickelt sich aus der Harnröhrenknospe, die sich mehrmals auf zweigt und das Tubulussystem der Niere bildet. Die Proteine Metalloproteinase 9 (**MMP9**) und Angiotensinogen (**AGT**) regulieren diesen Vorgang positiv (362). Während MMP9 mit steigendem GA signifikant zunahm, nahm AGT ab. **AGT** ist ein Bestandteil des Renin-Angiotensinogen-Systems (RAS) und reguliert den Blutdruck sowie den Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt (363). Gen-Mutationen des RAS (u.a. AGT) resultieren in einer gestörten Bildung des renalen Tubulussystems (364).

Aldehyd dehydrogenase 1A1 (**ALDH1A1**) nahm über beide Zeitachsen (signifikant) zu. Das Protein katalysiert die Reaktion von Vitamin A in seine aktive Form, die Retinolsäure. Die Nephrogenese wird durch die lokale Retinolsäure-Konzentration beeinflusst, sodass sogar ein maternaler Vitamin-A Mangel die finale Nephronanzahl in Nagetieren limitiert (365).

Organe benötigen in ihrer Entwicklung Eisen für eine Vielzahl von Funktionen. Ferritin light chain (**FTL**) ermöglicht Eisen in einer löslichen, nicht-toxischen Form zu speichern und spielt gleichzeitig eine Rolle für den Eisentransport zur Zelle. In der sich entwickelnden Niere mediiert FTL die Eisenaufnahme in die Zellen der Kapsel (366). FTL nahm postnatal bis zu einem kGA von 32 SSW signifikant ab und nahm dann wieder zu.

### Lunge

Die Proteine **MYH10** und Ceruloplasmin (**CP**) werden mit der fetalen *Lungenentwicklung* assoziiert. Während MYH10 über beide Zeitachsen abnahm, stieg CP sowohl entlang des GA als auch postnatal signifikant an. Mutationen von MYH10 in Welpen führten kurz nach der Geburt zu einer respiratorischen Anpassungsstörung. Der Verlust von MYH10 insbesondere in mesenchymalen Zellen resultierte in einer Vereinfachung der Alveolarstruktur über den Umbau der Extrazellulärmatrix (367).

## 4.3 Diskussion der Methodik

### 4.3.1 Massenspektrometrie

Massenspektrometrie (MS) ermöglicht im Gegensatz zu herkömmlichen Methoden hunderte von Proteinen gleichzeitig zu detektieren und hochspezifisch zu identifizieren (368). Bisherige Einschränkungen der MS, wie z.B. eine niedrige Sensitivität, eine hohe dynamische Bandbreite der Proteinkonzentrationen, eine fehlende Reproduzierbarkeit der Untersuchung (v.a. bei großen Kohorten), hohe Kosten oder ein geringer Durchsatz, konnten durch die technischen Fortschritte der letzten Jahre überwunden werden (132, 368-371). In der MS gibt es unterschiedliche Methoden der Probenaufbereitung- und präfraktionierung sowie verschiedene Arten des Massenanalysators (122). Diese unterscheiden sich insbesondere in der Anzahl und der Konzentrationsbreite der detektierten Proteine, die positiv mit der Dauer der vorausgehenden Proteinverdauung und MS-Messung korrelieren (372). Das Proteinprofil ist zudem abhängig von der Aufbereitungsmethode der Proben, was sich in nur einer geringen Überschneidung der durch LCMS-detektierten Proteine zeigte. Die Wahl erfolgt i.d.R. nach Probeart und Vorlieben des Anwenders (373). Neben der einfachen Handhabung und dem Kostenfaktor spielt im klinischen Alltag die zeitliche Verfügbarkeit von Laborergebnissen eine entscheidende Rolle. Geyer et al. konnte zeigen, dass eine ähnliche Analysetiefe (d.h. Anzahl und Konzentrationsbreite der detektierten Proteine) auch durch eine kürzere Probenaufbereitungs- und messzeit (< 60 min bzw. 20 min) erreicht und somit der Durchsatz erhöht werden kann (368). Da die Implementierung der Methodik in den klinischen Alltag und der damit einhergehende klinische Nutzen eine wichtige Voraussetzung für die Studie war, wurde die von Geyer et al. entwickelte Methode (LC-MS/MS) gewählt.

Bei der Untersuchung von Vollblut sind v.a. erythrozytäre Proteine in hohen Konzentrationen vorhanden und können dadurch weniger stark angereicherte Proteine „überdecken“. Darunter fallen u.a. auch Gewebeproteine, die ggf. Auskunft über die Organentwicklung geben können. Um diese Proteine besser untersuchen zu können, sollte die Analyse von Plasma erfolgen. Die jeweiligen Plasmaproben wurden bereits im Rahmen dieser Studie abgenommen und müssen noch ausgewertet werden.

Wir arbeiteten im Gegensatz zu einigen vorherigen Studien mit peripherem anstatt Nabelschnurblut. Die Abnahme erfolgte venös, kapillär oder arteriell. Die Vergleichbarkeit der Probearten war zuvor untersucht worden und hatte eine hohe Korrelation der Daten gezeigt.

Für ELISAs sollte die Probenlagerung für Protein-basierte Biomarker bei -80°C oder darunter liegen, um eine optimale Stabilität der Proteine für mind. 3 Monate zu gewährleisten (374). Für längere Zeiträume ist die Datenlage nur unzureichend. Nachdem in der Massenspektrometrie keine Protein-Epitope erhalten werden müssen, hat sich in der Shotgun-Proteomics eine hohe Variationstoleranz für das Probenhandhabung gezeigt. Es wurde von einer photosensitiven Protein-Stabilität von Trockenblutproben

für Monate bis Jahre berichtet (375, 376). Sogar eine partielle Proteindegradation ist noch tolerierbar, solange ein Großteil der später proteolytisch generierten Peptide unverändert bleiben (123). Die Trockenblutproben wurden alle in einem Zug massenspektrometrisch analysiert, um ein mögliches Bias zu vermeiden. Aus diesem Grund wurden die Blutproben jedoch erst 2-4 Jahre nach Abnahme ausgemessen.

Der Vorteil der MS liegt in der Generierung von ganzen Proteinmustern im Vergleich zu nur einzelnen Biomarkern. Die Kombination multipler Biomarker erhöht nicht nur die diagnostische Sensitivität und Spezifität (377-380), sondern erlaubt ein umfassenderes Bild über den Organismus, v.a. hinsichtlich der Anzahl möglicher Einflussfaktoren und Confounder, zu generieren. Durch die große Anzahl an betrachteten Proteinen steigt jedoch die Wahrscheinlichkeit, artifizielle bzw. falsch positive Unterschiede zu finden. Durch Einführung der Falscherkennungsrate (FDR) kann ein Gütekriterium geschaffen werden, welches mittels Benjamin-Hochberg-Prozedur den Anteil „falscher“ Treffer möglichst niedrig hält. Identifizierte Biomarker können ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Prozesse ermöglichen. Allerdings muss immer berücksichtigt werden, dass diese Proteine nicht immer direkter Bestandteil der Pathologie sind, sondern ggf. nur assoziiert (123).

#### **4.3.2 Studiendesign**

Vorherige Studienansätze, mit dem Ziel Biomarker zu finden, arbeiteten oft mit zu kleinen Kohortengrößen (Underpower) oder scheiterten aufgrund einer zu geringen statistischen Power durch Batch-Effekte im Rahmen eines multizentrischen Studiendesigns. Insbesondere bei seltenen Kohorten, wie z.B. (extrem frühe) FG, können nur begrenzt große standardisierte Kohorten innerhalb eines kurzen Zeitrahmens gesammelt werden. Die unabhängige Sammlung von Versuchs- und Kontrollgruppe stellt ein weiteres, häufiges Problem in Biomarker-Studien dar (381). In diesem Studiendesign wurde von einer Geburtskohorte ausgegangen und die Studienkohorten anhand der festgesetzten Kriterien (GA) erst im Nachhinein definiert, um ein Bias durch die Patientenrekrutierung und Probenhandhabung zu vermeiden. Ein Nachteil sind allerdings die resultierenden unterschiedlich großen Kohorten. Die FG-Gruppen unterscheiden sich stark in ihrer Größe und schränken so den Vergleich teilweise ein.

In Phase 3 der Patientenrekrutierung wurde für die Vergleichsgruppe der RG der Fokus u.a. auf Infektionen gelegt. Dadurch sind Infektionen in dieser Gruppe leicht überrepräsentiert. Aufgrund des hohen Anteils von Infektionen bei FG wurde jedoch davon abgesehen, die betreffenden Studienteilnehmer auszuschließen, um infektionsbedingte Unterschiede zu minimieren und die Entwicklung der FG somit besser beurteilen zu können.

Der NGS-Zeitpunkt wurde aus Praktikabilität als Standardabnahme für RG festgelegt. Eine routinemäßige Abnahme des Geburtszeitpunkts hätte sich für die Beurteilung der GA-abhängigen (intrauterinen) Entwicklung besser geeignet.

Zusätzlich ergab sich eine hohe Varianz der Daten, die zu einem Missverhältnis von Geschlecht, Erkrankungen, Ethnizität, Lebensstil der Eltern, ... in den Kohorten führen kann (381) und den alleinigen Einfluss des GA auf die Proteom-Entwicklung schwer zu interpretieren macht. Gleichzeitig werden klinische Faktoren, wie der Erkrankungszustand des FG, ebenfalls durch das GA und der damit zusammenhängenden System- bzw. Organentwicklung beeinflusst. Durch eine ausreichend große Studienpopulation gehen einzelne gering ausgeprägte klinische Faktoren (z.B. Erkrankungen der Eltern) im Rauschen der Daten unter und deren Konfundierungseffekt wird vernachlässigbar. Die Wichtigkeit der detaillierten Phänotypisierung der Studienpopulation wird in jedem Fall deutlich. In der vorliegenden Studie wurden über 400 klinische Datenpunkte erfasst. Einige dieser Datenpunkte sind jedoch nur für einen Teil der Kohorte verfügbar, wodurch Regressionsanalysen unter Einbeziehung möglicher Confounder schwierig waren.

Um die zeitliche Proteindynamik und damit (extrauterine) Entwicklung der FG beurteilen zu können, wurde ein longitudinales Studiendesign gewählt. Die Wahl der Abnahmezeitpunkte erfolgte anhand klinisch notwendiger Blutentnahmen (G, NGS, NGS 32+0, E), um ein zusätzliches Stechen der Neugeborenen zu vermeiden. Die Definition der ersten beiden Zeitpunkte erfolgte sehr strikt zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Geburt. Die Abnahme des dritten Zeitpunkts bei einem kGA von 32 SSW (NGS 32+0) war jedoch nur für einen Teil der Kohorte möglich (ExtFG, SehrFG) und variierte somit im postnatalen Alter der Kinder. Zeitpunkt E wurde sehr breit definiert und korrelierte mit keiner Routineblutentnahme, um ein mögliches langes Follow-Up zu ermöglichen. Die Abnahme erfolgte infolge nur bei einem geringen Anteil der FG (18%), variierte zeitlich stark und überdeckte sich bei SpätFG oft mit dem Abnahmezeitpunkt NGS 32+0 bei ExtFG und SehrFG. Besser wäre eine striktere Definition insbesondere der beiden letzten Abnahmezeitpunkte anhand der Lebensstunden nach Geburt. Es gilt zu beachten, dass das Follow Up von ExtFG insgesamt länger erfolgt, und Unterschiede dadurch ausgeprägter wirken können. Um eine stereotype Entwicklung des Blutproteoms zu beurteilen (ähnlich der stereotypen Entwicklung des Immunsystems (114, 116)) ist eine noch größere Kohorte nötig, die die Beurteilung der GA-abhängigen Entwicklung in wöchentlichen Abständen möglich macht. Zusätzlich sollte auch das Follow Up in regelmäßigeren, ggf. wöchentlichen Abständen sowie möglichst bis zum einem kGA von 40 SSW (RG) erfolgen.

### **4.3.3 Ethische Fragestellungen**

Ein universeller Test über den Gesundheitszustand des Menschen scheint verlockend, bringt jedoch einige ethische Fragestellungen mit sich.

Anhand des Expressionsmusters der Proteine und der Kombination von variierenden Peptiden in verschiedenen Proteinen kann der Patient reidentifiziert werden; unter der Voraussetzung, dass passenden genetische Informationen vorhanden sind (128). Zusätzlich werden Proteine gemessen, die sich nicht auf die ursprüngliche klinische Fragestellung beziehen und damit ggf. vertrauliche oder nicht beeinflussbare gesundheitliche Informationen/ Prädispositionen preis geben (128). Für diesen Fall oder auch um eine Überdiagnostik zu verhindern, ist der Fokus auf bestimmte Proteinkombinationen vorzuziehen (123). Dies wiederum steht allerdings im Widerspruch zur der Attraktivität der Massenspektrometrie.

## 5 Zusammenfassung

Die Blutbestandteile von FG und RG wurden in ihrer Dynamik über die beiden Zeitachsen (Gestations- und postnatales Alter) bereits umfangreich untersucht. Die Hauptstärke unserer Studie besteht v.a. in der tiefreichenden Analyse des Proteoms anhand von kleinsten Blutproben innerhalb kürzester Zeit. Auch wenn ein Großteil der Ergebnisse bereits bekannt ist, stellt diese Studie einen wichtigen Machbarkeitsnachweis dar, dass qualitativ hochwertige reproduzierbare biologische Systemanalysen auch mit nur geringen Probenmengen möglich sind. Die Anwendung der Trockenblutproben bietet darüber hinaus eine leichte Handhabung, sodass diese auch in großen Mengen leicht in den Klinikalltag implementiert werden können.

Mittels der gewählten Methodik der MS war es möglich, die bekannten Verläufe in einer einzigen Blutprobe zu detektieren und vor allem zueinander in Relation zu setzen. Somit konnten einerseits bereits bekannte Dynamiken des Blutproteoms bestätigt und andererseits assoziierte Proteine neu beschrieben werden. Insgesamt konnten unserer Ergebnisse einen wichtigen Einblick über v.a. immunbiologische Prozesse in FG an der Grenze der Lebensfähigkeit bis zu einem Alter von RG geben und die Dynamik der Proteine postnatal weiter beobachtet werden.

Die signifikanteste Änderung zeigten erythrozytäre Proteine und Hämoglobin. Im Sinne des Erythrozytenumsatzes nach Geburt konnte eine hochsignifikante Zunahme von CA1 und CA2 (vermehrtes Vorliegen in reifen Erythrozyten) und eine signifikante Abnahme der mitochondrialen (VDAC3, PRDX2 und 3) sowie ribosomalen Proteine (v.a. in unreifen Erythrozyten vorhanden) über das GA und postnatal beobachtet werden. Die Erythropoese beschreibt die Ausstoßung der Zellorganelle und des Zellkerns (Enukleation). Parallel nimmt die Retikulozyten-Zahl mit steigendem GA ab. Zusätzlich beschreiben unsere Daten die bekannte Transformation von embryonalem, zu fetalen (HbF), zu adultem Hämoglobin (HbA) über beide Zeitachsen. Wir konnten drei weitere Proteine (AHSP, TFRC, SMIM1) identifizieren, die mit der Erythropoese assoziiert und bis dato in ihrer Dynamik (abnehmend über beide Zeitachsen) in Neugeborenen noch nicht beschrieben wurden. Während AHSP die Aggregation von alpha-Hämoglobinketten verhindert, werden TFRC und SMIM1 als Oberflächenproteine v.a. auf Erythrozyten-Vorläuferzellen exprimiert. TFRC stabilisiert darüber hinaus den Erythropoetin-Rezeptor und nimmt dadurch indirekt Einfluss auf die Erythropoese.

Funktionelle Plasmaproteine stellen den Großteil des Plasmaproteoms dar und sind in ihrer Dynamik teilweise bereits umfangreich erforscht. Apolipoproteine ermöglichen den Transport von TAG und Cholesterin im Blut und spiegeln den Lipidstatus des Einzelnen wider. Während antiatherogene und protektive Apolipoproteine (APOA4, APOC1, APOA1) in FG vermindert angereichert waren und über beide Zeitachsen zunahm, zeigten proatherogene Apolipoproteine (APOC3) eine entgegengesetzte Dynamik. Das Lipidprofil im Kindesalter korreliert mit dem kardiovaskulären Risiko im Erwachsenen-

alter, sodass dieses Proteinprofil einen wichtigen Biomarker-Panel darstellt. Insbesondere APOA4 nahm postnatal innerhalb weniger Lebenstage hochsignifikant zu. Dies ist u.a. durch eine vermehrte intestinale Produktion als physiologische Reaktion auf die Nahrungsaufnahme zu sehen, nachdem insbesondere der fetale Darm und weniger die Leber APOA4-mRNA enthält.

Apolipoproteine (u.a. APOA1 und APOC1) haben zusätzlich eine immunsuppressive Wirkung, indem sie eine proinflammatorische Immunantwort verhindern. Der Anstieg über beide Zeitachsen könnte als Vorbereitung sowie physiologische Reaktion auf die Exposition mit der antigenreichen Umwelt interpretiert werden.

Das Blutgerinnungssystem von Neugeborenen und insbesondere FG wurde lange Zeit als unreif betrachtet. Vielmehr scheint es jedoch den intrauterinen Bedingungen angepasst zu sein. Sowohl thrombozytäre Proteine, Gerinnungsfaktoren als auch antikoagulatorische Faktoren waren in FG vermindert und nahmen im Sinne einer fetalen entwicklungsbedingten Regulation des Gerinnungssystems mit steigendem GA und postnatal zu. Durch eine frühzeitige Exposition gegenüber der extrauterinen Umwelt im Rahmen einer Frühgeburtlichkeit werden insbesondere Blutungskomplikationen (v.a. IVH) problematisch. Kompensatorisch stiegen im Vergleich sowohl thrombozytäre Proteine als auch Gerinnungsfaktoren extrauterin schneller an.

Bis zu 60% der ExtFG entwickeln während des Krankenhausaufenthalts mindestens einmal eine bakterielle Infektion. Ähnlich dem Gerinnungssystem ist auch das Immunsystem an die intrauterinen Bedürfnisse des Feten angepasst, um eine Aufrechterhaltung der fetomaternalen Toleranz zu gewährleisten (Dominanz der  $T_H2$ -Zellen) und eine potentiell schädliche  $T_H1$ -Polarisierung zu vermeiden. ANXA1 fördert die Differenzierung von  $TH1$ -Zellen gegenüber  $TH2$ -Zellen und war folglich in FG vermindert vorhanden. Neben seinen antimikrobiellen und antioxidativen Eigenschaften scheint S100A8/A9 ebenfalls eine immunmodulierende Rolle im Sinne einer Suppression der T-Zellproliferation zu spielen. Die erhöhte Infektanfälligkeiten von (Ext)FG ist neben der geringeren Anzahl an zytotoxischen  $T_H1$ -Zellen auf eine verminderte Konzentration von Komplementfaktoren sowie die geringere Anzahl von Granulozyten, Makrophagen und NK-Zellen und deren reduzierte Zytotoxizität zu erklären. Auf Proteinebene spiegelte sich dies in Form einer reduzierten Intensität von im Blut detektierbaren Granulainhalten (u.a. LYZ, LFT, LCN2, CAMP, CTSG) in FG wider. Die Proteine nahmen sowohl mit steigendem GA als auch postnatal zu.

Aus diesem Grund wird der frühere Infektionsschutz des Neugeborenen zu einem Großteil durch transplazentar übertragene Antikörper (IgG) gewährleistet. Der transplazentare Antikörpertransfer beginnt nach dem ersten Trimester und erreicht in den letzten 4 SSW sein Maximum. Parallel dazu konnten wir mit steigendem GA auch eine Zunahme der Immunglobuline beobachten. Bei einer Halbwertszeit von 21-30 Tagen sinkt die neonatale IgG-Konzentration wieder ab. Das Neugeborene beginnt erst nach

Geburt durch den Kontakt mit der extrauterinen Umwelt die endogene Antikörpersynthese und fällt im Vergleich hinter dem transplazentaren Transfer zurück. Dies kann zusätzlich die erhöhte Infektanfälligkeit von FG mit sinkendem GA erklären.

Das Blut kommuniziert mit allen Organen des Körpers. Durch sekretierte oder im Rahmen von Zellschädigung freigesetzte Proteine kann demnach eine Aussage über die Reifung der Organe getroffen werden. Dabei beschreiben wir erstmals die GA-abhängige und postnatale Dynamik von Proteinen, die eine Rolle in der zerebralen (u.a. TFRC, MMP9, ATP6V1A, AP2M1, CLTC, DST, SARS, CSNK2A1, FN1), kardialen (u.a. HSPG2 und POSTN), renalen (MMP9, AGT, ALDH1A1, FTL) und pulmonalen (MYH10, CP) Entwicklung spielen. Klinisch konnte eine erhöhte Inzidenz von Gehirnanomalien und eine verminderte zerebrale Reifung bei Feten mit einer kongenitalen Herzerkrankung (v.a. VSD oder ASD) beobachtet werden. Dies spiegelt sich auch auf Proteinebene in unseren Daten wider. Proteine (ANK2, FLNA, TKT, MYH10), die sowohl mit der kardialen als auch zerebralen Entwicklung assoziiert sind, zeigen eine signifikante Dynamik über mind. eine der beiden Zeitachsen. Der genaue Mechanismus bzw. Funktion der Proteine ist allerdings meist noch unklar.

## **6 Schlussfolgerung und Ausblick**

Um einen tieferen Einblick über die Dynamik weniger angereicherter Proteine zu erlangen, die u.a. einen Einblick in die Organentwicklung geben können, eignet sich die Analyse von Plasma. Die jeweiligen Plasmaproben wurden im Rahmen dieser Studie bereits parallel abgenommen. So können die Ergebnisse der Vollblut- und Plasmaanalyse miteinander verglichen und mögliche Unterschiede durch eine andere Kohorte ausgeschlossen werden. Für die Etablierung von Biomarkern für typische Erkrankungen des FG, die mit einer beeinträchtigten Organogenese im kausalen Zusammenhang stehen, sollte ein anderes Studiendesign im Sinne von Fall-Kontroll-Studien mit einer möglichst ausgewogenen Kohortenbildung erfolgen.

Diese Studie untersuchte als einer der ersten das Blutproteom von FG in einem so großen Umfang mit dem neusten Stand der Technik. Sie dient als wichtige Grundlage für noch folgende Studien. Insbesondere bei der Überprüfung der Wirksamkeit von Therapie oder Interventionen erfolgt die longitudinale Abnahme von Blut. Somit muss v.a. bei FG mit der noch stattfindenden Organreifung ein möglicher Therapieeffekt von der physiologischen Dynamik des Proteinprofils abgegrenzt werden.

Olin et al. konnte auf Zellebene zeigen, dass die neonatale Immunantwort die der Eltern widerspiegelt, was auf eine Art Imprinting des angeborenen und erworbenen Immunsystems schließen lässt (114). Um dies auf Proteinebene zu bestätigen, sollten zukünftige Studien die Untersuchung des Blutproteoms von Neugeborenen und der Eltern kombinieren.

Durch die kombinierte Untersuchung von klinischen Daten und Proteinmustern des Blutes kann in Zukunft eine umfangreiche Datenbasis geschaffen werden, um ein globales Bild über die Entwicklungsstufen der Organe und des Organismus von FG zu erlangen. Anhand bestimmter Proteinmuster wird der Einfluss von Störfaktoren (u.a. Krankheit, Therapie und Lebensstil) sichtbar (123). Die detektierten Biomarker-Panels sollen in Zukunft der besseren Diagnostik und frühzeitigen Erkennung von möglichen Entwicklungsdefiziten oder pathophysiologischen Vorgängen dienen und können ggf. einen neuen Therapieansatz ermöglichen (123). Für die Validierung der Ergebnisse sind weitere Studien, u.a. am Tiermodell nötig. Durch die Kombination mit den anderen Omics-Technologien, wie z.B. Microbiomics, Metabolomics oder Genomics kann das Bild des physiologischen Zustands weiter vervollständigt werden (157, 172, 173).

## 7 Literaturverzeichnis

1. Walani SR. Global burden of preterm birth. *Int J Gynaecol Obstet.* 2020;150(1):31-3.
2. Chawanpaiboon S, Vogel JP, Moller AB, Lumbiganon P, Petzold M, Hogan D, et al. Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis. *Lancet Glob Health.* 2019;7(1):e37-e46.
3. Lawn JE, Cousens S, Zupan J. 4 million neonatal deaths: when? Where? Why? *Lancet.* 2005;365(9462):891-900.
4. Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller AB, Narwal R, et al. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet.* 2012;379(9832):2162-72.
5. Delnord M, Blondel B, Zeitlin J. What contributes to disparities in the preterm birth rate in European countries? *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2015;27(2):133-142.
6. Martin JA, Hamilton BE, Osterman MJK, Driscoll AK. Births: Final Data for 2019. *Natl Vital Stat Rep.* 2021;70(2):1-51.
7. Ruiz M, Goldblatt P, Morrison J, Kukla L, Švancara J, Riitta-Järvelin M, et al. Mother's education and the risk of preterm and small for gestational age birth: a DRIVERS meta-analysis of 12 European cohorts. *J Epidemiol Community Health.* 2015;69(9):826-33.
8. World Health Organization (WHO). Preterm birth [homepage]; 2018, February 19 [cited 2021, October 23]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>.
9. Saigal S, Doyle LW. An overview of mortality and sequelae of preterm birth from infancy to adulthood. *Lancet.* 2008;371(9608):261-9.
10. Kramer MS, Demissie K, Yang H, Platt RW, Sauvé R, Liston R. The contribution of mild and moderate preterm birth to infant mortality. Fetal and Infant Health Study Group of the Canadian Perinatal Surveillance System. *Jama.* 2000;284(7):843-9.
11. De Costa A, Moller AB, Blencowe H, Johansson EW, Hussain-Alkhateeb L, Ohuma EO, et al. Study protocol for WHO and UNICEF estimates of global, regional, and national preterm birth rates for 2010 to 2019. *PLoS One.* 2021;16(10):e0258751.
12. Jones M. Effect of preterm birth on airway function and lung growth. *Paediatr Respir Rev.* 2009;10 Suppl 1:9-11.
13. Jarjour IT. Neurodevelopmental outcome after extreme prematurity: a review of the literature. *Pediatr Neurol.* 2015;52(2):143-52.
14. Platt MJ. Outcomes in preterm infants. *Public Health.* 2014;128(5):399-403.
15. Roberts D, Dalziel S. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006(3):Cd004454.
16. Wirbelauer J, Speer CP. The role of surfactant treatment in preterm infants and term newborns with acute respiratory distress syndrome. *Journal of Perinatology.* 2009;29(2):S18-S22.
17. Gultom E, Doyle LW, Davis P, Dharmalingam A, Bowman E. Changes over time in attitudes to treatment and survival rates for extremely preterm infants (23-27 weeks' gestational age). *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 1997;37(1):56-8.
18. Doyle LW, Rogerson S, Chuang SL, James M, Bowman ED, Davis PG. Why do preterm infants die in the 1990s? *Med J Aust.* 1999;170(11):528-32.
19. Simmons LE, Rubens CE, Darmstadt GL, Gravett MG. Preventing preterm birth and neonatal mortality: exploring the epidemiology, causes, and interventions. *Semin Perinatol.* 2010;34(6):408-15.
20. Glass HC, Costarino AT, Stayer SA, Brett CM, Cladis F, Davis PJ. Outcomes for extremely premature infants. *Anesth Analg.* 2015;120(6):1337-51.
21. Patel RM. Short- and Long-Term Outcomes for Extremely Preterm Infants. *Am J Perinatol.* 2016;33(3):318-28.
22. Baraldi E, Filippone M. Chronic lung disease after premature birth. *N Engl J Med.* 2007;357(19):1946-55.
23. Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, Shankaran S, Laptook AR, Walsh MC, et al. Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics.* 2010;126(3):443-56.

24. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(5):379-90.
25. Helderman JB, Welch CD, Leng X, O'Shea TM. Sepsis-associated electroencephalographic changes in extremely low gestational age neonates. *Early Hum Dev.* 2010;86(8):509-13.
26. Volpe JJ. Perinatal brain injury: from pathogenesis to neuroprotection. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2001;7(1):56-64.
27. Hoo AF, Dezateux C, Henschen M, Costeloe K, Stocks J. Development of airway function in infancy after preterm delivery. *J Pediatr.* 2002;141(5):652-8.
28. Glumoff V, Väyrynen O, Kangas T, Hallman M. Degree of lung maturity determines the direction of the interleukin-1- induced effect on the expression of surfactant proteins. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;22(3):280-8.
29. Gubhaju L, Sutherland MR, Black MJ. Preterm birth and the kidney: implications for long-term renal health. *Reprod Sci.* 2011;18(4):322-33.
30. Peterson LS, Hedou J, Ganio EA, Stelzer IA, Feyaerts D, Harbert E, et al. Single-Cell Analysis of the Neonatal Immune System Across the Gestational Age Continuum. *Front Immunol.* 2021;12:714090.
31. Stephens BE, Vohr BR. Neurodevelopmental outcome of the premature infant. *Pediatr Clin North Am.* 2009;56(3):631-46, Table of Contents.
32. Colin AA, McEvoy C, Castile RG. Respiratory morbidity and lung function in preterm infants of 32 to 36 weeks' gestational age. *Pediatrics.* 2010;126(1):115-28.
33. Crump C. Preterm birth and mortality in adulthood: a systematic review. *J Perinatol.* 2020;40(6):833-43.
34. Escobar GJ, Clark RH, Greene JD. Short-term outcomes of infants born at 35 and 36 weeks gestation: we need to ask more questions. *Semin Perinatol.* 2006;30(1):28-33.
35. Mohan SS, Jain L. Late preterm birth: preventable prematurity? *Clin Perinatol.* 2011;38(3):547-55.
36. Wang ML, Dorer DJ, Fleming MP, Catlin EA. Clinical outcomes of near-term infants. *Pediatrics.* 2004;114(2):372-6.
37. McIntire DD, Leveno KJ. Neonatal mortality and morbidity rates in late preterm births compared with births at term. *Obstet Gynecol.* 2008;111(1):35-41.
38. Ramachandrapa A, Jain L. Health issues of the late preterm infant. *Pediatr Clin North Am.* 2009;56(3):565-77, Table of Contents.
39. Natarajan G, Shankaran S. Short- and Long-Term Outcomes of Moderate and Late Preterm Infants. *Am J Perinatol.* 2016;33(3):305-17.
40. Petrou S, Yiu HH, Kwon J. Economic consequences of preterm birth: a systematic review of the recent literature (2009-2017). *Arch Dis Child.* 2019;104(5):456-65.
41. Hornman J, de Winter AF, Kerstjens JM, Bos AF, Reijneveld SA. Emotional and Behavioral Problems of Preterm and Full-Term Children at School Entry. *Pediatrics.* 2016;137(5):e20152255.
42. Spittle AJ, McGinley JL, Thompson D, Clark R, FitzGerald TL, Mentiplay BF, et al. Motor trajectories from birth to 5 years of children born at less than 30 weeks' gestation: early predictors and functional implications. Protocol for a prospective cohort study. *J Physiother.* 2016;62(4):222-3.
43. Dhamrait GK, Christian H, O'Donnell M, Pereira G. Gestational age and child development at school entry. *Sci Rep.* 2021;11(1):14522.
44. Kwinta P, Pietrzyk JJ. Preterm birth and respiratory disease in later life. *Expert Rev Respir Med.* 2010;4(5):593-604.
45. Stern DA, Morgan WJ, Wright AL, Guerra S, Martinez FD. Poor airway function in early infancy and lung function by age 22 years: a non-selective longitudinal cohort study. *Lancet.* 2007;370(9589):758-64.
46. Crump C. An overview of adult health outcomes after preterm birth. *Early Hum Dev.* 2020;150:105187.
47. Crump C, Sundquist J, Sundquist K. Risk of hypertension into adulthood in persons born prematurely: a national cohort study. *Eur Heart J.* 2020;41(16):1542-50.

48. Crump C, Sundquist J, Winkleby MA, Sundquist K. Preterm birth and risk of chronic kidney disease from childhood into mid-adulthood: national cohort study. *Bmj*. 2019;365:11346.
49. Kelm M. Early birth affects vascular function. *Eur Heart J*. 2020;41(16):1551-1553.
50. Markopoulou P, Papanikolaou E, Analytis A, Zoumakis E, Siahaidou T. Preterm Birth as a Risk Factor for Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease in Adult Life: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Pediatr*. 2019;210:69-80.e5.
51. Abitbol CL, Rodriguez MM. The long-term renal and cardiovascular consequences of prematurity. *Nat Rev Nephrol*. 2012;8(5):265-74.
52. Rees S, Inder T. Fetal and neonatal origins of altered brain development. *Early Hum Dev*. 2005;81(9):753-61.
53. Jobe AH, Bancalari E. An All-Inclusive Perspective on Bronchopulmonary Dysplasia. *J Pediatr*. 2021;234:257-9.
54. Volpe JJ. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *Lancet Neurol*. 2009;8(1):110-24.
55. Ajayi-Obe M, Saeed N, Cowan FM, Rutherford MA, Edwards AD. Reduced development of cerebral cortex in extremely preterm infants. *Lancet*. 2000;356(9236):1162-3.
56. Childs AM, Ramenghi LA, Cornette L, Tanner SF, Arthur RJ, Martinez D, et al. Cerebral maturation in premature infants: quantitative assessment using MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2001;22(8):1577-82.
57. De Asis-Cruz J, Kapse K, Basu SK, Said M, Scheinost D, Murnick J, et al. Functional brain connectivity in ex utero premature infants compared to in utero fetuses. *Neuroimage*. 2020;219:117043.
58. Kapellou O, Counsell SJ, Kennea N, Dyet L, Saeed N, Stark J, et al. Abnormal cortical development after premature birth shown by altered allometric scaling of brain growth. *PLoS Med*. 2006;3(8):e265.
59. Rakic P, Caviness VS, Jr. Cortical development: view from neurological mutants two decades later. *Neuron*. 1995;14(6):1101-4.
60. McQuillen PS, Ferriero DM. Perinatal subplate neuron injury: implications for cortical development and plasticity. *Brain Pathol*. 2005;15(3):250-60.
61. Universität Freiburg LuBS. Online Embryologiekurs für Studierende der Medizin [blog on the internet]; cited 2021, December 29; Available from: <https://embryology.ch/de/organogenese/nervensystem/grundlagen-der-gehirnentwicklung/>.
62. Volpe JJ. The encephalopathy of prematurity--brain injury and impaired brain development inextricably intertwined. *Semin Pediatr Neurol*. 2009;16(4):167-78.
63. Dean JM, McClendon E, Hansen K, Azimi-Zonooz A, Chen K, Riddle A, et al. Prenatal cerebral ischemia disrupts MRI-defined cortical microstructure through disturbances in neuronal arborization. *Sci Transl Med*. 2013;5(168):168ra7.
64. Schneider J, Miller SP. Preterm brain Injury: White matter injury. *Handb Clin Neurol*. 2019;162:155-72.
65. Ball G, Boardman JP, Rueckert D, Aljabar P, Arichi T, Merchant N, et al. The effect of preterm birth on thalamic and cortical development. *Cereb Cortex*. 2012;22(5):1016-24.
66. Rees S, Harding R. Brain development during fetal life: influences of the intra-uterine environment. *Neurosci Lett*. 2004;361(1-3):111-4.
67. Duerden EG, Taylor MJ, Miller SP. Brain development in infants born preterm: looking beyond injury. *Semin Pediatr Neurol*. 2013;20(2):65-74.
68. Rezaie P, Dean A. Periventricular leukomalacia, inflammation and white matter lesions within the developing nervous system. *Neuropathology*. 2002;22(3):106-32.
69. Buser JR, Maire J, Riddle A, Gong X, Nguyen T, Nelson K, et al. Arrested preoligodendrocyte maturation contributes to myelination failure in premature infants. *Ann Neurol*. 2012;71(1):93-109.
70. Riddle A, Dean J, Buser JR, Gong X, Maire J, Chen K, et al. Histopathological correlates of magnetic resonance imaging-defined chronic perinatal white matter injury. *Ann Neurol*. 2011;70(3):493-507.

71. Vinall J, Grunau RE, Brant R, Chau V, Poskitt KJ, Synnes AR, et al. Slower postnatal growth is associated with delayed cerebral cortical maturation in preterm newborns. *Sci Transl Med.* 2013;5(168):168ra8.
72. Hellström A, Smith LE, Dammann O. Retinopathy of prematurity. *Lancet.* 2013;382(9902):1445-57.
73. Mahoney AD, Jain L. Respiratory disorders in moderately preterm, late preterm, and early term infants. *Clin Perinatol.* 2013;40(4):665-78.
74. Burri PH. Fetal and postnatal development of the lung. *Annu Rev Physiol.* 1984;46:617-28.
75. Jain L, Eaton DC. Physiology of fetal lung fluid clearance and the effect of labor. *Semin Perinatol.* 2006;30(1):34-43.
76. Moss TJ. Respiratory consequences of preterm birth. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006;33(3):280-4.
77. Faa G, Gerosa C, Fanni D, Nemolato S, Locci A, Cabras T, et al. Marked interindividual variability in renal maturation of preterm infants: lessons from autopsy. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2010;23 Suppl 3:129-33.
78. Grandi C. Alterations in fetal kidney development and increased risk for adult diseases. *Arch Argent Pediatr.* 2021;119(5):e480-e6.
79. Abitbol CL, DeFreitas MJ, Strauss J. Assessment of kidney function in preterm infants: lifelong implications. *Pediatr Nephrol.* 2016;31(12):2213-22.
80. Hinchliffe SA, Sargent PH, Howard CV, Chan YF, van Velzen D. Human intrauterine renal growth expressed in absolute number of glomeruli assessed by the disector method and Cavalieri principle. *Lab Invest.* 1991;64(6):777-84.
81. Rodríguez MM, Gómez AH, Abitbol CL, Chandar JJ, Duara S, Zilleruelo GE. Histomorphometric analysis of postnatal glomerulogenesis in extremely preterm infants. *Pediatr Dev Pathol.* 2004;7(1):17-25.
82. Black MJ, Sutherland MR, Gubhaju L, Kent AL, Dahlstrom JE, Moore L. When birth comes early: effects on nephrogenesis. *Nephrology (Carlton).* 2013;18(3):180-2.
83. Charlton JR, Springsteen CH, Carmody JB. Nephron number and its determinants in early life: a primer. *Pediatr Nephrol.* 2014;29(12):2299-308.
84. Gerhard Aumüller GA, Arne Conrad. *Duale Reihe Anatomie. 5.* Stuttgart: Thieme; 2020. p. 622-625.
85. van der Linde D, Konings EE, Slager MA, Witsenburg M, Helbing WA, Takkenberg JJ, et al. Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58(21):2241-7.
86. Tanner K, Sabine N, Wren C. Cardiovascular malformations among preterm infants. *Pediatrics.* 2005;116(6):e833-8.
87. Reller MD, Strickland MJ, Riehle-Colarusso T, Mahle WT, Correa A. Prevalence of congenital heart defects in metropolitan Atlanta, 1998-2005. *J Pediatr.* 2008;153(6):807-13.
88. Dovjak GO, Zalewski T, Seidl-Mlczech E, Ulm PA, Berger-Kulemann V, Weber M, et al. Abnormal Extracardiac Development in Fetuses With Congenital Heart Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2021;78(23):2312-22.
89. Limperopoulos C, Tworetzky W, McElhinney DB, Newburger JW, Brown DW, Robertson RL, Jr., et al. Brain volume and metabolism in fetuses with congenital heart disease: evaluation with quantitative magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Circulation.* 2010;121(1):26-33.
90. Khalil A, Bennet S, Thilaganathan B, Paladini D, Griffiths P, Carvalho JS. Prevalence of prenatal brain abnormalities in fetuses with congenital heart disease: a systematic review. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016;48(3):296-307.
91. Rios DR, Bhattacharya S, Levy PT, McNamara PJ. Circulatory Insufficiency and Hypotension Related to the Ductus Arteriosus in Neonates. *Front Pediatr.* 2018;6:62.
92. Gournay V. The ductus arteriosus: physiology, regulation, and functional and congenital anomalies. *Arch Cardiovasc Dis.* 2011;104(11):578-85.

93. Shinde SR, Basantwani S, Tendolkar B. Anesthetic management of patent ductus arteriosus in adults. *Ann Card Anaesth.* 2016;19(4):750-1.
94. Stassen JM, Arnout J, Deckmyn H. The hemostatic system. *Curr Med Chem.* 2004;11(17):2245-60.
95. Andrew M, Paes B, Milner R, Johnston M, Mitchell L, Tollefsen DM, et al. Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood.* 1987;70(1):165-72.
96. Venkatesh V, Curley A, Khan R, Clarke P, Watts T, Josephson C, et al. A novel approach to standardised recording of bleeding in a high risk neonatal population. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2013;98(3):F260-3.
97. Poryo M, Boeckh JC, Gortner L, Zemlin M, Duppré P, Ebrahimi-Fakhari D, et al. Ante-, peri- and postnatal factors associated with intraventricular hemorrhage in very premature infants. *Early Hum Dev.* 2018;116:1-8.
98. Andrew M, Paes B, Milner R, Johnston M, Mitchell L, Tollefsen DM, et al. Development of the human coagulation system in the healthy premature infant. *Blood.* 1988;72(5):1651-7.
99. Barnard DR, Simmons MA, Hathaway WE. Coagulation studies in extremely premature infants. *Pediatr Res.* 1979;13(12):1330-5.
100. Strunk T, Currie A, Richmond P, Simmer K, Burgner D. Innate immunity in human newborn infants: prematurity means more than immaturity. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011;24(1):25-31.
101. Kumar SK, Bhat BV. Distinct mechanisms of the newborn innate immunity. *Immunol Lett.* 2016;173:42-54.
102. Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie.* Stuttgart: Thieme; 2019. 752 p.
103. Behrends JC, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, Hoth M, Kurtz A, Leipziger J. *Physiologie.* Stuttgart: Thieme; 2021. 210-212.
104. McHeyzer-Williams M, Okitsu S, Wang N, McHeyzer-Williams L. Molecular programming of B cell memory. *Nat Rev Immunol.* 2011;12(1):24-34.
105. Schelonka RL, Infante AJ. Neonatal immunology. *Semin Perinatol.* 1998;22(1):2-14.
106. Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, Liotta F, Annunziato F. T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry A.* 2014;85(1):36-42.
107. Debock I, Flamand V. Unbalanced Neonatal CD4(+) T-Cell Immunity. *Front Immunol.* 2014;5:393.
108. Jennewein MF, Butler AL, Alter G. Neonate-omics: Charting the Unknown Immune Response in Early Life. *Cell.* 2018;174(5):1051-3.
109. Cinicola B, Conti MG, Terrin G, Sgrulletti M, Elfeky R, Carsetti R, et al. The Protective Role of Maternal Immunization in Early Life. *Front Pediatr.* 2021;9:638871.
110. Sangild PT, Strunk T, Currie AJ, Nguyen DN. Editorial: Immunity in Compromised Newborns. *Front Immunol.* 2021;12:732332.
111. Belderbos ME, Levy O, Meyaard L, Bont L. Plasma-mediated immune suppression: a neonatal perspective. *Pediatr Allergy Immunol.* 2013;24(2):102-13.
112. Kollmann TR, Kampmann B, Mazmanian SK, Marchant A, Levy O. Protecting the Newborn and Young Infant from Infectious Diseases: Lessons from Immune Ontogeny. *Immunity.* 2017;46(3):350-363.
113. Palmeira P, Quinello C, Silveira-Lessa AL, Zago CA, Carneiro-Sampaio M. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:985646.
114. Olin A, Henckel E, Chen Y, Lakshmikanth T, Pou C, Mikes J, et al. Stereotypic Immune System Development in Newborn Children. *Cell.* 2018;174(5):1277-92.e14.
115. Birlé A, Nebe CT, Hill S, Hartmann K, Poeschl J, Koch L. Neutrophil chemotaxis in cord blood of term and preterm neonates is reduced in preterm neonates and influenced by the mode of delivery and anaesthesia. *PLoS One.* 2015;10(4):e0120341.
116. Nussbaum C, Gloning A, Pruenster M, Frommhold D, Bierschenk S, Genzel-Boroviczény O, et al. Neutrophil and endothelial adhesive function during human fetal ontogeny. *J Leukoc Biol.* 2013;93(2):175-84.

117. Siegrist CA, Aspinall R. B-cell responses to vaccination at the extremes of age. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(3):185-94.
118. Aebersold R, Mann M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature.* 2016;537(7620):347-55.
119. Anderson NL. The clinical plasma proteome: a survey of clinical assays for proteins in plasma and serum. *Clin Chem.* 2010;56(2):177-85.
120. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics.* 2002;1(11):845-67.
121. Rassow J HK, Deutzmann R, Netzker R. *Duale Reihe Biochemie. 4.* Stuttgart: Thieme; 2016. p. 442-488.
122. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature.* 2003;422(6928):198-207.
123. Geyer PE, Holdt LM, Teupser D, Mann M. Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. *Mol Syst Biol.* 2017;13(9):942.
124. Lundberg E, Borner GH. Spatial proteomics: a powerful discovery tool for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(5):285-302.
125. Geyer PE, Voytik E, Treit PV, Doll S, Kleinhempel A, Niu L, et al. Plasma Proteome Profiling to detect and avoid sample-related biases in biomarker studies. *EMBO Mol Med.* 2019;11(11):e10427.
126. Martin NJ, Bunch J, Cooper HJ. Dried blood spot proteomics: surface extraction of endogenous proteins coupled with automated sample preparation and mass spectrometry analysis. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2013;24(8):1242-9.
127. Geyer PE, Wewer Albrechtsen NJ, Tyanova S, Grassl N, Iepsen EW, Lundgren J, et al. Proteomics reveals the effects of sustained weight loss on the human plasma proteome. *Mol Syst Biol.* 2016;12(12):901.
128. Geyer PE, Mann SP, Treit PV, Mann M. Plasma proteomes can be re-identifiable and potentially contain personally sensitive and incidental findings. *Mol Cell Proteomics.* 2021;20:100035.
129. Dodig-Crnković T, Hong MG, Thomas CE, Häussler RS, Bendes A, Dale M, et al. Facets of individual-specific health signatures determined from longitudinal plasma proteome profiling. *EBioMedicine.* 2020;57:102854.
130. Mischak H, Allmaier G, Apweiler R, Attwood T, Baumann M, Benigni A, et al. Recommendations for biomarker identification and qualification in clinical proteomics. *Sci Transl Med.* 2010;2(46):46ps2.
131. Skates SJ, Gillette MA, LaBaer J, Carr SA, Anderson L, Liebler DC, et al. Statistical design for biospecimen cohort size in proteomics-based biomarker discovery and verification studies. *J Proteome Res.* 2013;12(12):5383-94.
132. Surinova S, Schiess R, Hüttenhain R, Cerciello F, Wollscheid B, Aebersold R. On the development of plasma protein biomarkers. *J Proteome Res.* 2011;10(1):5-16.
133. Niu L, Geyer PE, Wewer Albrechtsen NJ, Gluud LL, Santos A, Doll S, et al. Plasma proteome profiling discovers novel proteins associated with non-alcoholic fatty liver disease. *Mol Syst Biol.* 2019;15(3):e8793.
134. Geyer PE, Arend FM, Doll S, Louiset ML, Virreira Winter S, Müller-Reif JB, et al. High-resolution serum proteome trajectories in COVID-19 reveal patient-specific seroconversion. *EMBO Mol Med.* 2021;13(8):e14167.
135. Wewer Albrechtsen NJ, Geyer PE, Doll S, Treit PV, Bojsen-Møller KN, Martinussen C, et al. Plasma Proteome Profiling Reveals Dynamics of Inflammatory and Lipid Homeostasis Markers after Roux-En-Y Gastric Bypass Surgery. *Cell Syst.* 2018;7(6):601-12.e3.
136. Virreira Winter S, Karayel O, Strauss MT, Padmanabhan S, Surface M, Merchant K, et al. Urinary proteome profiling for stratifying patients with familial Parkinson's disease. *EMBO Mol Med.* 2021;13(3):e13257.
137. Grassl N, Kulak NA, Pichler G, Geyer PE, Jung J, Schubert S, et al. Ultra-deep and quantitative saliva proteome reveals dynamics of the oral microbiome. *Genome Med.* 2016;8(1):44.
138. Doll S, Dreßen M, Geyer PE, Itzhak DN, Braun C, Doppler SA, et al. Region and cell-type resolved quantitative proteomic map of the human heart. *Nat Commun.* 2017;8(1):1469.

139. Eshghi A, Pistawka AJ, Liu J, Chen M, Sinclair NJT, Hardie DB, et al. Concentration Determination of >200 Proteins in Dried Blood Spots for Biomarker Discovery and Validation. *Mol Cell Proteomics*. 2020;19(3):540-553.
140. Ignjatovic V, Geyer PE, Palaniappan KK, Chaaban JE, Omenn GS, Baker MS, et al. Mass Spectrometry-Based Plasma Proteomics: Considerations from Sample Collection to Achieving Translational Data. *J Proteome Res*. 2019;18(12):4085-4097.
141. Wild D. *The immunoassay handbook : theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques*. Fourth edition. ed2013.
142. Hein MY, Sharma K, Cox J, Mann M. Chapter 1 - Proteomic Analysis of Cellular Systems. In: Walhout AJM, Vidal M, Dekker J, editors. *Handbook of Systems Biology*. San Diego: Academic Press; 2013. p. 3-25.
143. Robitaille AM, Arrey TN, Kellmann M, Kreutzmann A, Mourad D, Ferrer DL, et al., editors. Improved Identification, Quantification Accuracy, and Workflow Efficiency using a Modified Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometer and Tandem Mass Tags (TMT) Approach 2019. Available from <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/posters/pn-65541-tmt-quantitation-quadrupole-orbitrap-ms-asms2019-pn65541-en.pdf>.
144. Müller-Reif JB. *Mass spectrometry-based proteomics: from deep proteomes to clinical application [Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades]*. München: LMU-München; 2021. p. 16.
145. Horváth C, Melander W, Molnár I. Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases. *Journal of Chromatography A*. 1976;125(1):129-56.
146. Kanakoudi F, Drossou V, Tzimouli V, Diamanti E, Konstantinidis T, Germeis A, et al. Serum concentrations of 10 acute-phase proteins in healthy term and preterm infants from birth to age 6 months. *Clin Chem*. 1995;41(4):605-8.
147. Aversa MR, Barbagallo CM, Di Paola G, Labisi M, Pinna G, Marino G, et al. Lipids, lipoproteins and apolipoproteins AI, AII, B, CII, CIII and E in newborns. *Biol Neonate*. 1991;60(3-4):187-92.
148. McConathy WJ, Lane DM. Studies on the apolipoproteins and lipoproteins of cord serum. *Pediatr Res*. 1980;14(5):757-61.
149. Dolphin PJ, Breckenridge WC, Dolphin MA, Tan MH. The lipoproteins of human umbilical cord blood apolipoprotein and lipid levels. *Atherosclerosis*. 1984;51(1):109-22.
150. Ghaemi S, Najafi R, Kelishadi R. Cord blood lipoprotein profile in term, preterm, and late preterm newborns. *J Res Med Sci*. 2014;19(11):1038-40.
151. McCafferty C, Chaaban J, Ignjatovic V. Plasma proteomics and the paediatric patient. *Expert Rev Proteomics*. 2019;16(5):401-411.
152. Letunica N, Cai T, Cheong JLY, Doyle LW, Monagle P, Ignjatovic V. The use of proteomics for blood biomarker research in premature infants: a scoping review. *Clin Proteomics*. 2021;18(1):13.
153. Delanghe JR, Speckaert MM. Translational research and biomarkers in neonatal sepsis. *Clin Chim Acta*. 2015;451(Pt A):46-64.
154. Ng PC, Ang IL, Chiu RW, Li K, Lam HS, Wong RP, et al. Host-response biomarkers for diagnosis of late-onset septicemia and necrotizing enterocolitis in preterm infants. *J Clin Invest*. 2010;120(8):2989-3000.
155. Tosson AMS, Glaser K, Weinhage T, Foell D, Aboualam MS, Edris AA, et al. Evaluation of the S100 protein A12 as a biomarker of neonatal sepsis. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2020;33(16):2768-74.
156. Agakidou E, Agakidis C, Gika H, Sarafidis K. Emerging Biomarkers for Prediction and Early Diagnosis of Necrotizing Enterocolitis in the Era of Metabolomics and Proteomics. *Front Pediatr*. 2020;8:602255.
157. Stewart CJ, Nelson A, Treumann A, Skeath T, Cummings SP, Embleton ND, et al. Metabolomic and proteomic analysis of serum from preterm infants with necrotising enterocolitis and late-onset sepsis. *Pediatr Res*. 2016;79(3):425-31.
158. Buhimschi CS, Bhandari V, Dulay AT, Nayeri UA, Abdel-Razeq SS, Pettker CM, et al. Proteomics mapping of cord blood identifies haptoglobin "switch-on" pattern as biomarker of early-onset neonatal sepsis in preterm newborns. *PLoS One*. 2011;6(10):e26111.

159. Zasada M, Suski M, Bokinić R, Szwarc-Duma M, Borszewska-Kornacka MK, Madej J, et al. Comparative two time-point proteome analysis of the plasma from preterm infants with and without bronchopulmonary dysplasia. *Ital J Pediatr.* 2019;45(1):112.
160. Arjaans S, Wagner BD, Mourani PM, Mandell EW, Poindexter BB, Berger RMF, et al. Early angiogenic proteins associated with high risk for bronchopulmonary dysplasia and pulmonary hypertension in preterm infants. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2020;318(4):L644-L654.
161. Hou HT, Xi Z, Wang J, Liu LX, Zhang JF, Yang Q, et al. Altered plasma proteins released from platelets and endothelial cells are associated with human patent ductus arteriosus. *J Cell Physiol.* 2019;234(5):6842-53.
162. Xu C, Su X, Chen Y, Xu Y, Wang Z, Mo X. Proteomics analysis of plasma protein changes in patent ductus arteriosus patients. *Ital J Pediatr.* 2020;46(1):64.
163. Zhang X, Wang K, Yang Q, Wang J, Xuan C, Liu XC, et al. Acute phase proteins altered in the plasma of patients with congenital ventricular septal defect. *Proteomics Clinical applications.* 2015;9(11-12):1087-96.
164. Lynch AM, Wagner BD, Mandava N, Palestine AG, Mourani PM, McCourt EA, et al. The Relationship of Novel Plasma Proteins in the Early Neonatal Period With Retinopathy of Prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57(11):5076-5082.
165. Danielsson H, Tebani A, Zhong W, Fagerberg L, Brusselaers N, Hård AL, et al. Blood protein profiles related to preterm birth and retinopathy of prematurity. *Pediatr Res.* 2021;91(4):937-946.
166. Pecks U, Kirschner I, Wolter M, Schlembach D, Koy C, Rath W, et al. Mass spectrometric profiling of cord blood serum proteomes to distinguish infants with intrauterine growth restriction from those who are small for gestational age and from control individuals. *Transl Res.* 2014;164(1):57-69.
167. Wölter M, Röwer C, Koy C, Reimer T, Rath W, Pecks U, et al. A proteome signature for intrauterine growth restriction derived from multifactorial analysis of mass spectrometry-based cord blood serum profiling. *Electrophoresis.* 2012;33(12):1881-93.
168. Ruis-González MD, Cañete MD, Gómez-Chaparro JL, Abril N, Cañete R, López-Barea J. Alterations of protein expression in serum of infants with intrauterine growth restriction and different gestational ages. *J Proteomics.* 2015;119:169-82.
169. Wolter M, Rower C, Koy C, Reimer T, Rath W, Pecks U, et al. A proteome signature for intrauterine growth restriction derived from multifactorial analysis of mass spectrometry-based cord blood serum profiling. *Electrophoresis.* 2012;33(12):1881-93.
170. Suski M, Bokinić R, Szwarc-Duma M, Madej J, Bujak-Giżycka B, Borszewska-Kornacka MK, et al. Plasma proteome changes in cord blood samples from preterm infants. *J Perinatol.* 2018;38(9):1182-9.
171. Suski M, Bokinić R, Szwarc-Duma M, Madej J, Bujak-Giżycka B, Kwinta P, et al. Prospective plasma proteome changes in preterm infants with different gestational ages. *Pediatr Res.* 2018;84(1):104-11.
172. Lee AH, Shannon CP, Amenyogbe N, Bennike TB, Diray-Arce J, Idoko OT, et al. Dynamic molecular changes during the first week of human life follow a robust developmental trajectory. *Nat Commun.* 2019;10(1):1092.
173. Bennike TB, Fatou B, Angelidou A, Diray-Arce J, Falsafi R, Ford R, et al. Preparing for Life: Plasma Proteome Changes and Immune System Development During the First Week of Human Life. *Front Immunol.* 2020;11:578505.
174. Zhong W, Danielsson H, Tebani A, Karlsson MJ, Elfvin A, Hellgren G, et al. Dramatic changes in blood protein levels during the first week of life in extremely preterm infants. *Pediatr Res.* 2021;89(3):604-12.
175. Balbus JM, Barouki R, Birnbaum LS, Etzel RA, Gluckman PD, Sr., Grandjean P, et al. Early-life prevention of non-communicable diseases. *Lancet.* 2013;381(9860):3-4.
176. Ignjatovic V, Lai C, Summerhayes R, Mathesius U, Tawfilis S, Perugini MA, et al. Age-related differences in plasma proteins: how plasma proteins change from neonates to adults. *PLoS One.* 2011;6(2):e17213.

177. Bjelosevic S, Pascovici D, Ping H, Karlaftis V, Zaw T, Song X, et al. Quantitative Age-specific Variability of Plasma Proteins in Healthy Neonates, Children and Adults. *Mol Cell Proteomics*. 2017;16(5):924-35.
178. Kulak NA, Pichler G, Paron I, Nagaraj N, Mann M. Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nat Methods*. 2014;11(3):319-24.
179. Grinfeld D, Aizikov K, Kreutzmann A, Damoc E, Makarov A. Phase-Constrained Spectrum Deconvolution for Fourier Transform Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 2017;89(2):1202-11.
180. Scheltema RA, Mann M. SprayQc: a real-time LC-MS/MS quality monitoring system to maximize uptime using off the shelf components. *J Proteome Res*. 2012;11(6):3458-66.
181. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol*. 2008;26(12):1367-72.
182. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods*. 2016;13(9):731-40.
183. Cox J, Mann M. 1D and 2D annotation enrichment: a statistical method integrating quantitative proteomics with complementary high-throughput data. *BMC Bioinformatics*. 2012;13 Suppl 16(Suppl 16):S12.
184. Wehinger H. Zur Natur und ontogenetischen Entwicklung von Carboanhydrase-Isoenzymen in menschlichen Erythrozyten. *Blut*. 1973;27(3):172-85.
185. Mondrup M, Anker N. Carbonic anhydrase isoenzymes in the erythrocytes of new-born premature and full-term infants. *Clin Chim Acta*. 1975;61(2):127-33.
186. Rahmani Z, Maunoury C, Siddiqui A. Isolation of a novel human voltage-dependent anion channel gene. *Eur J Hum Genet*. 1998;6(4):337-40.
187. Marginedas-Freixa I, Hattab C, Bouyer G, Halle F, Chene A, Lefevre SD, et al. TSPO ligands stimulate ZnPPIX transport and ROS accumulation leading to the inhibition of *P. falciparum* growth in human blood. *Sci Rep*. 2016;6:33516.
188. Joshi S, Kotecha S. Lung growth and development. *Early Hum Dev*. 2007;83(12):789-94.
189. Kuure S, Vuolteenaho R, Vainio S. Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation. *Mech Dev*. 2000;92(1):31-45.
190. Maritz GS, Morley CJ, Harding R. Early developmental origins of impaired lung structure and function. *Early Hum Dev*. 2005;81(9):763-71.
191. Blohm ME, Vesterling-Hörner D, Calaminus G, Göbel U. Alpha 1-fetoprotein (AFP) reference values in infants up to 2 years of age. *Pediatr Hematol Oncol*. 1998;15(2):135-42.
192. Wu JT, Book L, Sudar K. Serum alpha fetoprotein (AFP) levels in normal infants. *Pediatr Res*. 1981;15(1):50-2.
193. Sinclair GD, Brasch K. The nucleated erythrocyte: a model of cell differentiation. *Rev Can Biol*. 1975;34(4):287-303.
194. Mei Y, Liu Y, Ji P. Understanding terminal erythropoiesis: An update on chromatin condensation, enucleation, and reticulocyte maturation. *Blood Rev*. 2021;46:100740.
195. Paterakis GS, Lykopoulou L, Papassotiriou J, Stamulakatou A, Kattamis C, Loukopoulos D. Flow-cytometric analysis of reticulocytes in normal cord blood. *Acta Haematol*. 1993;90(4):182-5.
196. Yamada M, Chishiki M, Kanai Y, Goto A, Imamura T. Neonatal reticulocyte count during the early postnatal period. *Pediatr Neonatol*. 2020;61(5):490-7.
197. Weed RI, Reed CF, Berg G. Is hemoglobin an essential structural component of human erythrocyte membranes? *J Clin Invest*. 1963;42(4):581-8.
198. Sutherland-Smith AJ, Baker HM, Hofmann OM, Brittain T, Baker EN. Crystal structure of a human embryonic haemoglobin: the carbonmonoxy form of gower II (alpha2 epsilon2) haemoglobin at 2.9 Å resolution. *J Mol Biol*. 1998;280(3):475-84.
199. Rassow J HK, Deutzmann R, Netzker R. *Duale Reihe Biochemie*. Stuttgart: Thieme; 2016. 575-782 p.
200. Kidd RD, Russell JE, Watmough NJ, Baker EN, Brittain T. The role of beta chains in the control of the hemoglobin oxygen binding function: chimeric human/mouse proteins, structure, and function. *Biochemistry*. 2001;40(51):15669-75.

201. Clegg JB, Gagnon J. Structure of the zeta chain of human embryonic hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(10):6076-80.
202. Randhawa ZI, Jones RT, Lie-Injo LE. Human hemoglobin Portland II (zeta 2 beta 2). Isolation and characterization of Portland hemoglobin components and their constituent globin chains. *J Biol Chem*. 1984;259(11):7325-30.
203. Lau ET, Kwok YK, Chui DH, Wong HS, Luo HY, Tang MH. Embryonic and fetal globins are expressed in adult erythroid progenitor cells and in erythroid cell cultures. *Prenat Diagn*. 2001;21(7):529-39.
204. Salsbury DC. Anemia of prematurity. *Neonatal Netw*. 2001;20(5):13-20.
205. Detsika MG, Lianos EA. Hemopexin Modulates Expression of Complement Regulatory Proteins in Rat Glomeruli. *Curr Issues Mol Biol*. 2021;43(2):1081-1089.
206. Asleh R, Marsh S, Shilkrot M, Binah O, Guetta J, Lejbkowitz F, et al. Genetically determined heterogeneity in hemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease. *Circ Res*. 2003;92(11):1193-200.
207. di Masi A, De Simone G, Ciaccio C, D'Orso S, Coletta M, Ascenzi P. Haptoglobin: From hemoglobin scavenging to human health. *Mol Aspects Med*. 2020;73:100851.
208. Mauk MR, Smith A, Mauk AG. An alternative view of the proposed alternative activities of hemopexin. *Protein Sci*. 2011;20(5):791-805.
209. Kihm AJ, Kong Y, Hong W, Russell JE, Rouda S, Adachi K, et al. An abundant erythroid protein that stabilizes free alpha-haemoglobin. *Nature*. 2002;417(6890):758-63.
210. Feng L, Gell DA, Zhou S, Gu L, Kong Y, Li J, et al. Molecular mechanism of AHSP-mediated stabilization of alpha-hemoglobin. *Cell*. 2004;119(5):629-40.
211. Che Yaacob NS, Islam MA, Alsaleh H, Ibrahim IK, Hassan R. Alpha-hemoglobin-stabilizing protein (AHSP): a modulatory factor in  $\beta$ -thalassemia. *Int J Hematol*. 2020;111(3):352-359.
212. Senyilmaz D, Virtue S, Xu X, Tan CY, Griffin JL, Miller AK, et al. Regulation of mitochondrial morphology and function by stearoylation of TFR1. *Nature*. 2015;525(7567):124-8.
213. Tomc J, Debeljak N. Molecular Pathways Involved in the Development of Congenital Erythrocytosis. *Genes (Basel)*. 2021;12(8):1150.
214. Forejtniková H, Vieillevoys M, Zermati Y, Lambert M, Pellegrino RM, Guihard S, et al. Transferrin receptor 2 is a component of the erythropoietin receptor complex and is required for efficient erythropoiesis. *Blood*. 2010;116(24):5357-5367.
215. Cvejic A, Haer-Wigman L, Stephens JC, Kostadima M, Smethurst PA, Frontini M, et al. SMIM1 underlies the Vel blood group and influences red blood cell traits. *Nat Genet*. 2013;45(5):542-545.
216. Zhou X, Liao WJ, Liao JM, Liao P, Lu H. Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome. *J Mol Cell Biol*. 2015;7(2):92-104.
217. Odintsova TI, Müller EC, Ivanov AV, Egorov TA, Bienert R, Vladimirov SN, et al. Characterization and analysis of posttranslational modifications of the human large cytoplasmic ribosomal subunit proteins by mass spectrometry and Edman sequencing. *J Protein Chem*. 2003;22(3):249-58.
218. Gripp KW, Curry C, Olney AH, Sandoval C, Fisher J, Chong JX, et al. Diamond-Blackfan anemia with mandibulofacial dystostosis is heterogeneous, including the novel DBA genes TSR2 and RPS28. *Am J Med Genet A*. 2014;164a(9):2240-9.
219. Landowski M, O'Donohue MF, Buros C, Ghazvinian R, Montel-Lehry N, Vlachos A, et al. Novel deletion of RPL15 identified by array-comparative genomic hybridization in Diamond-Blackfan anemia. *Hum Genet*. 2013;132(11):1265-74.
220. Flygare J, Aspesi A, Bailey JC, Miyake K, Caffrey JM, Karlsson S, et al. Human RPS19, the gene mutated in Diamond-Blackfan anemia, encodes a ribosomal protein required for the maturation of 40S ribosomal subunits. *Blood*. 2007;109(3):980-6.
221. Gazda HT, Sheen MR, Vlachos A, Choessel V, O'Donohue MF, Schneider H, et al. Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *Am J Hum Genet*. 2008;83(6):769-80.
222. Bolze A, Mahlaoui N, Byun M, Turner B, Trede N, Ellis SR, et al. Ribosomal protein SA haploinsufficiency in humans with isolated congenital asplenia. *Science*. 2013;340(6135):976-8.

223. Le Caignec C, Ory B, Lamoureux F, O'Donohue MF, Orgebin E, Lindenbaum P, et al. RPL13 Variants Cause Spondyloepimetaphyseal Dysplasia with Severe Short Stature. *Am J Hum Genet.* 2019;105(5):1040-1047.
224. Mirabello L, Khincha PP, Ellis SR, Giri N, Brodie S, Chandrasekharappa SC, et al. Novel and known ribosomal causes of Diamond-Blackfan anaemia identified through comprehensive genomic characterisation. *J Med Genet.* 2017;54(6):417-25.
225. Lauer SJ, Walker D, Elshourbagy NA, Reardon CA, Levy-Wilson B, Taylor JM. Two copies of the human apolipoprotein C-I gene are linked closely to the apolipoprotein E gene. *J Biol Chem.* 1988;263(15):7277-86.
226. Melhem H, Kallol S, Huang X, Lüthi M, Ontsouka CE, Keogh A, et al. Placental secretion of apolipoprotein A1 and E: the anti-atherogenic impact of the placenta. *Sci Rep.* 2019;9(1):6225.
227. Ingelsson E, Schaefer EJ, Contois JH, McNamara JR, Sullivan L, Keyes MJ, et al. Clinical Utility of Different Lipid Measures for Prediction of Coronary Heart Disease in Men and Women. *JAMA.* 2007;298(7):776-85.
228. Jensen MK, Bertoia ML, Cahill LE, Agarwal I, Rimm EB, Mukamal KJ. Novel metabolic biomarkers of cardiovascular disease. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10(11):659-72.
229. Hirano T. Pathophysiology of Diabetic Dyslipidemia. *J Atheroscler Thromb.* 2018;25(9):771-82.
230. Juonala M, Viikari JS, Kähönen M, Solakivi T, Helenius H, Jula A, et al. Childhood levels of serum apolipoproteins B and A-I predict carotid intima-media thickness and brachial endothelial function in adulthood: the cardiovascular risk in young Finns study. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52(4):293-9.
231. Bastida S, Cuesta C, Perea S, Aragonés A, Sánchez-Muniz FJ. Lipid and lipoprotein changes throughout the term-period in neonates from the Toledo Study. *Rev Esp Fisiol.* 1996;52(1):23-9.
232. Lane DM, McConathy WJ. Factors Affecting the Lipid and Apolipoprotein Levels of Cord Sera. *Pediatric Research.* 1983;17(2):83-91.
233. Pecks U, Mohaupt MG, Hütten MC, Maass N, Rath W, Escher G. Cholesterol acceptor capacity is preserved by different mechanisms in preterm and term fetuses. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1841(2):251-8.
234. Kwiterovich PO, Jr., Virgil DG, Garrett ES, Otvos J, Driggers R, Blakemore K, et al. Lipoprotein heterogeneity at birth: influence of gestational age and race on lipoprotein subclasses and Lp (a) lipoprotein. *Ethn Dis.* 2004;14(3):351-9.
235. Genzel-Boroviczeny O, Forte TM, Austin MA. High-density lipoprotein subclass distribution and human cord blood lipid levels. *Pediatr Res.* 1986;20(6):487-91.
236. Wong WM, Gerry AB, Putt W, Roberts JL, Weinberg RB, Humphries SE, et al. Common variants of apolipoprotein A-IV differ in their ability to inhibit low density lipoprotein oxidation. *Atherosclerosis.* 2007;192(2):266-74.
237. Westerterp M, Berbée JF, Delsing DJ, Jong MC, Gijbels MJ, Dahlmans VE, et al. Apolipoprotein C-I binds free fatty acids and reduces their intracellular esterification. *J Lipid Res.* 2007;48(6):1353-61.
238. Parker CR, Jr., Fortunato SJ, Carr BR, Owen J, Hankins GD, Hauth JC. Apolipoprotein A-1 in umbilical cord blood of newborn infants: relation to gestational age and high-density lipoprotein cholesterol. *Pediatr Res.* 1988;23(4):348-51.
239. Zannis VI, Breslow JL. Genetic mutations affecting human lipoprotein metabolism. *Adv Hum Genet.* 1985;14:125-215, 383-6.
240. Kumar A, Pandit K, Chatterjee P, Mukhopadhyay P, Ghosh S. Lipid Profile in Infant. *Indian J Endocrinol Metab.* 2021;25(1):20-22.
241. Genzel-Boroviczeny O, D'Harlingue AE, Kao LC, Scott C, Forte TM. High-density lipoprotein subclass distribution in premature newborns before and after the onset of enteral feeding. *Pediatr Res.* 1988;23(6):543-7.
242. Fujita H, Okada T, Inami I, Makimoto M, Hosono S, Minato M, et al. Low-density lipoprotein profile changes during the neonatal period. *J Perinatol.* 2008;28(5):335-40.
243. Steinmetz A, Czekelius P, Thiemann E, Motzny S, Kaffarnik H. Changes of apolipoprotein A-IV in the human neonate: evidence for different inductions of apolipoproteins A-IV and A-I in the postpartum period. *Atherosclerosis.* 1988;69(1):21-7.

244. Marcel YL, Vezina C, Milne RW. Cholesteryl ester and apolipoprotein E transfer between human high density lipoproteins and chylomicrons. *Biochim Biophys Acta*. 1983;750(2):411-7.
245. Curtiss LK, Boisvert WA. Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2000;11(3):243-51.
246. Huang Y, Mahley RW. Apolipoprotein E: structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. *Neurobiol Dis*. 2014;72 Pt A:3-12.
247. Baum L, Chen L, Ng HK, Pang CP. Apolipoprotein E isoforms in Alzheimer's disease pathology and etiology. *Microsc Res Tech*. 2000;50(4):278-81.
248. Tensaouti Y, Stephanz EP, Yu TS, Kernie SG. ApoE Regulates the Development of Adult Newborn Hippocampal Neurons. *eNeuro*. 2018;5(4):ENEURO.0155-18.2018.
249. Hong S, Washington PM, Kim A, Yang CP, Yu TS, Kernie SG. Apolipoprotein E Regulates Injury-Induced Activation of Hippocampal Neural Stem and Progenitor Cells. *J Neurotrauma*. 2016;33(4):362-74.
250. Chan DC, Chen MM, Ooi EM, Watts GF. An ABC of apolipoprotein C-III: a clinically useful new cardiovascular risk factor? *Int J Clin Pract*. 2008;62(5):799-809.
251. Boscarino G, Conti MG, Di Chiara M, Bianchi M, Onestà E, Faccioli F, et al. Early Enteral Feeding Improves Tolerance of Parenteral Nutrition in Preterm Newborns. *Nutrients*. 2021;13(11):3886.
252. Holtrop P, Swails T, Riggs T. Hypertriglyceridemia in extremely low birth weight infants receiving lipid emulsions. *J Neonatal Perinatal Med*. 2015;8(2):133-6.
253. Berbée JF, Havekes LM, Rensen PC. Apolipoproteins modulate the inflammatory response to lipopolysaccharide. *J Endotoxin Res*. 2005;11(2):97-103.
254. Fu P, Wang AM, He LY, Song JM, Xue JC, Wang CQ. Elevated serum ApoE levels are associated with bacterial infections in pediatric patients. *J Microbiol Immunol Infect*. 2014;47(2):122-9.
255. Bourika V, Hantzi E, Michos A, Margeli A, Papassotiriou I, Sihanidou T. Clinical Value of Serum Amyloid-A Protein, High-density Lipoprotein Cholesterol and Apolipoprotein-A1 in the Diagnosis and Follow-up of Neonatal Sepsis. *Pediatr Infect Dis J*. 2020;39(8):749-755.
256. Wang L, Chen WZ, Wu MP. Apolipoprotein A-I inhibits chemotaxis, adhesion, activation of THP-1 cells and improves the plasma HDL inflammatory index. *Cytokine*. 2010;49(2):194-200.
257. Berbée JF, van der Hoogt CC, Kleemann R, Schippers EF, Kitchens RL, van Dissel JT, et al. Apolipoprotein C1 stimulates the response to lipopolysaccharide and reduces mortality in gram-negative sepsis. *Faseb j*. 2006;20(12):2162-4.
258. Davenport P, Sola-Visner M. Hemostatic Challenges in Neonates. *Front Pediatr*. 2021;9:627715.
259. Margraf A, Nussbaum C, Rohwedder I, Klapproth S, Kurz ARM, Florian A, et al. Maturation of Platelet Function During Murine Fetal Development In Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(6):1076-86.
260. Wiedmeier SE, Henry E, Sola-Visner MC, Christensen RD. Platelet reference ranges for neonates, defined using data from over 47,000 patients in a multihospital healthcare system. *J Perinatol*. 2009;29(2):130-6.
261. Gianazza E, Brioschi M, Baetta R, Mallia A, Banfi C, Tremoli E. Platelets in Healthy and Disease States: From Biomarkers Discovery to Drug Targets Identification by Proteomics. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(12):4541.
262. Jayo A, Pabón D, Lastres P, Jiménez-Yuste V, González-Manchón C. Type II Glanzmann thrombasthenia in a compound heterozygote for the alpha IIb gene. A novel missense mutation in exon 27. *Haematologica*. 2006;91(10):1352-9.
263. Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Muramatsu H, et al. ACTN1 mutations cause congenital macrothrombocytopenia. *Am J Hum Genet*. 2013;92(3):431-8.
264. Falet H, Pollitt AY, Begonja AJ, Weber SE, Duerschmied D, Wagner DD, et al. A novel interaction between FlnA and Syk regulates platelet ITAM-mediated receptor signaling and function. *J Exp Med*. 2010;207(9):1967-79.

265. Nieswandt B, Moser M, Pleines I, Varga-Szabo D, Monkley S, Critchley D, et al. Loss of talin1 in platelets abrogates integrin activation, platelet aggregation, and thrombus formation in vitro and in vivo. *J Exp Med*. 2007;204(13):3113-8.
266. Yang H, Lang S, Zhai Z, Li L, Kahr WH, Chen P, et al. Fibrinogen is required for maintenance of platelet intracellular and cell-surface P-selectin expression. *Blood*. 2009;114(2):425-36.
267. Somers WS, Tang J, Shaw GD, Camphausen RT. Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1. *Cell*. 2000;103(3):467-79.
268. Jensen T, Kierulf P, Sandset PM, Klingenberg O, Joø GB, Godal HC, et al. Fibrinogen and fibrin induce synthesis of proinflammatory cytokines from isolated peripheral blood mononuclear cells. *Thromb Haemost*. 2007;97(5):822-9.
269. Smiley ST, King JA, Hancock WW. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol*. 2001;167(5):2887-94.
270. Davalos D, Akassoglou K. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Semin Immunopathol*. 2012;34(1):43-62.
271. Liu F, Zhao C, Liu L, Ding H, Huo R, Shi Z. Peptidome profiling of umbilical cord plasma associated with gestational diabetes-induced fetal macrosomia. *J Proteomics*. 2016;139:38-44.
272. Echtler K, Stark K, Lorenz M, Kerstan S, Walch A, Jennen L, et al. Platelets contribute to postnatal occlusion of the ductus arteriosus. *Nat Med*. 2010;16(1):75-82.
273. Jaffray J, Young G. Developmental hemostasis: clinical implications from the fetus to the adolescent. *Pediatr Clin North Am*. 2013;60(6):1407-17.
274. Wolach B, Dolfin T, Regev R, Gilboa S, Schlesinger M. The development of the complement system after 28 weeks' gestation. *Acta Paediatr*. 1997;86(5):523-7.
275. Salonvaara M, Riikonen P, Kekomäki R, Vahtera E, Mahlamäki E, Halonen P, et al. Effects of gestational age and prenatal and perinatal events on the coagulation status in premature infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2003;88(4):F319-23.
276. Del Vecchio A, Latini G, Henry E, Christensen RD. Template bleeding times of 240 neonates born at 24 to 41 weeks gestation. *J Perinatol*. 2008;28(6):427-31.
277. Pearce WJ, Khorram O. Maturation and differentiation of the fetal vasculature. *Clin Obstet Gynecol*. 2013;56(3):537-48.
278. Kuperman AA, Brenner B, Kenet G. Intraventricular hemorrhage in preterm infants and coagulation--ambivalent perspectives? *Thromb Res*. 2013;131 Suppl 1:S35-8.
279. Andrew M, Vegh P, Johnston M, Bowker J, Ofosu F, Mitchell L. Maturation of the hemostatic system during childhood. *Blood*. 1992;80(8):1998-2005.
280. Schmidt B, Mitchell L, Ofosu FA, Andrew M. Alpha-2-macroglobulin is an important progressive inhibitor of thrombin in neonatal and infant plasma. *Thromb Haemost*. 1989;62(4):1074-7.
281. Sottrup-Jensen L. Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *J Biol Chem*. 1989;264(20):11539-42.
282. Lagrange J, Lecompte T, Knopp T, Lacolley P, Regnault V. Alpha-2-macroglobulin in hemostasis and thrombosis: an underestimated old double-edged sword. *J Thromb Haemost*. 2022;20(4):806-815.
283. Adinolfi M. Human complement: onset and site of synthesis during fetal life. *Am J Dis Child*. 1977;131(9):1015-23.
284. Galindo-Sevilla N, Reyes-Arroyo F, Mancilla-Ramírez J. The role of complement in preterm birth and prematurity. *J Perinat Med*. 2019;47(8):793-803.
285. Grumach AS, Ceccon ME, Rutz R, Fertig A, Kirschfink M. Complement profile in neonates of different gestational ages. *Scand J Immunol*. 2014;79(4):276-81.
286. Aulak KS, Davis AE, 3rd, Donaldson VH, Harrison RA. Chymotrypsin inhibitory activity of normal C1-inhibitor and a P1 Arg to His mutant: evidence for the presence of overlapping reactive centers. *Protein Sci*. 1993;2(5):727-32.
287. Hochepped T, Berger FG, Baumann H, Libert C. Alpha(1)-acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003;14(1):25-34.

288. Mestriner FL, Spiller F, Laure HJ, Souto FO, Tavares-Murta BM, Rosa JC, et al. Acute-phase protein alpha-1-acid glycoprotein mediates neutrophil migration failure in sepsis by a nitric oxide-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(49):19595-600.
289. Elg SA, Mayer AR, Carson LF, Twigg LB, Hill RB, Ramakrishnan S. Alpha-1 acid glycoprotein is an immunosuppressive factor found in ascites from ovaria carcinoma. *Cancer*. 1997;80(8):1448-1456.
290. Gemelli C, Martello A, Montanari M, Zanocco Marani T, Salsi V, Zappavigna V, et al. The Orosomucoid 1 protein is involved in the vitamin D - mediated macrophage de-activation process. *Exp Cell Res*. 2013;319(20):3201-13.
291. Shiyon SD, Bovin NV. Carbohydrate composition and immunomodulatory activity of different glycoforms of alpha1-acid glycoprotein. *Glycoconj J*. 1997;14(5):631-8.
292. Drenth JP, Göertz J, Daha MR, van der Meer JW. Immunoglobulin D enhances the release of tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta as well as interleukin-1 receptor antagonist from human mononuclear cells. *Immunology*. 1996;88(3):355-62.
293. Ceciliani F, Lecchi C. The Immune Functions of  $\alpha(1)$  Acid Glycoprotein. *Curr Protein Pept Sci*. 2019;20(6):505-524.
294. Nakatani Y, Yamazaki M, Chazin WJ, Yui S. Regulation of S100A8/A9 (calprotectin) binding to tumor cells by zinc ion and its implication for apoptosis-inducing activity. *Mediators Inflamm*. 2005;2005(5):280-292.
295. Miyasaki KT, Bodeau AL, Murthy AR, Lehrer RI. In vitro antimicrobial activity of the human neutrophil cytosolic S-100 protein complex, calprotectin, against *Capnocytophaga sputigena*. *J Dent Res*. 1993;72(2):517-23.
296. Li C, Chen H, Ding F, Zhang Y, Luo A, Wang M, et al. A novel p53 target gene, S100A9, induces p53-dependent cellular apoptosis and mediates the p53 apoptosis pathway. *Biochem J*. 2009;422(2):363-72.
297. Koike A, Arai S, Yamada S, Nagae A, Saita N, Itoh H, et al. Dynamic mobility of immunological cells expressing S100A8 and S100A9 in vivo: a variety of functional roles of the two proteins as regulators in acute inflammatory reaction. *Inflammation*. 2012;35(2):409-419.
298. Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol*. 2003;170(6):3233-42.
299. Golubinskaya V, Puttonen H, Fyhr IM, Rydbeck H, Hellström A, Jacobsson B, et al. Expression of S100A Alarmins in Cord Blood Monocytes Is Highly Associated With Chorioamnionitis and Fetal Inflammation in Preterm Infants. *Front Immunol*. 2020;11:1194.
300. Heinemann AS, Pirr S, Fehlhaber B, Mellinger L, Burgmann J, Busse M, et al. In neonates S100A8/S100A9 alarmins prevent the expansion of a specific inflammatory monocyte population promoting septic shock. *Faseb j*. 2017;31(3):1153-1164.
301. Perretti M, D'Acquisto F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(1):62-70.
302. Arcone R, Arpaia G, Ruoppolo M, Malorni A, Pucci P, Marino G, et al. Structural characterization of a biologically active human lipocortin 1 expressed in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*. 1993;211(1-2):347-355.
303. Sugimoto MA, Vago JP, Teixeira MM, Sousa LP. Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: Modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and Clearance. *J Immunol Res*. 2016;2016:8239258.
304. D'Acquisto F, Merghani A, Lecona E, Rosignoli G, Raza K, Buckley CD, et al. Annexin-1 modulates T-cell activation and differentiation. *Blood*. 2007;109(3):1095-102.
305. Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI. SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem*. 1989;264(29):17213-17221.
306. Delclaux C, Delacourt C, D'Ortho MP, Boyer V, Lafuma C, Harf A. Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996;14(3):288-95.

307. Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengeløv H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem.* 1993;268(14):10425-32.
308. Dubois B, Starckx S, Pagenstecher A, Oord J, Arnold B, Opdenakker G. Gelatinase B deficiency protects against endotoxin shock. *Eur J Immunol.* 2002;32(8):2163-71.
309. Chan ZC, Oentaryo MJ, Lee CW. MMP-mediated modulation of ECM environment during axonal growth and NMJ development. *Neurosci Lett.* 2020;724:134822.
310. Dear ML, Dani N, Parkinson W, Zhou S, Broadie K. Two classes of matrix metalloproteinases reciprocally regulate synaptogenesis. *Development.* 2016;143(1):75-87.
311. Levy O, Martin S, Eichenwald E, Ganz T, Valore E, Carroll SF, et al. Impaired innate immunity in the newborn: newborn neutrophils are deficient in bactericidal/permeability-increasing protein. *Pediatrics.* 1999;104(6):1327-33.
312. Li X, Li Y, Han H, Miller DW, Wang G. Solution structures of human LL-37 fragments and NMR-based identification of a minimal membrane-targeting antimicrobial and anticancer region. *J Am Chem Soc.* 2006;128(17):5776-85.
313. Gabay JE, Scott RW, Campanelli D, Griffith J, Wilde C, Marra MN, et al. Antibiotic proteins of human polymorphonuclear leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(14):5610-4.
314. Shields-Cutler RR, Crowley JR, Miller CD, Stapleton AE, Cui W, Henderson JP. Human Metabolome-derived Cofactors Are Required for the Antibacterial Activity of Siderocalin in Urine. *J Biol Chem.* 2016;291(50):25901-25910.
315. Drossou V, Kanakoudi F, Tzimouli V, Sarafidis K, Taparkou A, Bougiouklis D, et al. Impact of prematurity, stress and sepsis on the neutrophil respiratory burst activity of neonates. *Biol Neonate.* 1997;72(4):201-9.
316. Cooley J, Takayama TK, Shapiro SD, Schechter NM, Remold-O'Donnell E. The serpin MNEI inhibits elastase-like and chymotrypsin-like serine proteases through efficient reactions at two active sites. *Biochemistry.* 2001;40(51):15762-70.
317. Choi YJ, Kim S, Choi Y, Nielsen TB, Yan J, Lu A, et al. SERPINB1-mediated checkpoint of inflammatory caspase activation. *Nat Immunol.* 2019;20(3):276-87.
318. Strunk T, Doherty D, Richmond P, Simmer K, Charles A, Levy O, et al. Reduced levels of antimicrobial proteins and peptides in human cord blood plasma. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2009;94(3):F230-1.
319. Baker HM, Baker EN. A structural perspective on lactoferrin function. *Biochem Cell Biol.* 2012;90(3):320-8.
320. Velliyagounder K, Kaplan JB, Furgang D, Legarda D, Diamond G, Parkin RE, et al. One of two human lactoferrin variants exhibits increased antibacterial and transcriptional activation activities and is associated with localized juvenile periodontitis. *Infect Immun.* 2003;71(11):6141-6147.
321. Bellamy W, Takase M, Yamauchi K, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1121(1-2):130-6.
322. Pammi M, Abrams SA. Oral lactoferrin for the prevention of sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015(2):Cd007137.
323. Wasiluk KR, Skubitz KM, Gray BH. Comparison of granule proteins from human polymorphonuclear leukocytes which are bactericidal toward *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* 1991;59(11):4193-200.
324. Bagshaw RD, Callahan JW, Mahuran DJ. The Arf-family protein, Arl8b, is involved in the spatial distribution of lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;344(4):1186-1191.
325. Hofmann I, Munro S. An N-terminally acetylated Arf-like GTPase is localised to lysosomes and affects their motility. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 8):1494-503.
326. Khatter D, Raina VB, Dwivedi D, Sindhwani A, Bahl S, Sharma M. The small GTPase Arl8b regulates assembly of the mammalian HOPS complex on lysosomes. *J Cell Sci.* 2015;128(9):1746-1761.
327. Tuli A, Thierry J, James AM, Michelet X, Sharma M, Garg S, et al. Arf-like GTPase Arl8b regulates lytic granule polarization and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Mol Biol Cell.* 2013;24(23):3721-35.

328. Schroeder HW, Jr., Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S41-S52.
329. Simister NE. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine.* 2003;21(24):3365-9.
330. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol.* 2014;5:520.
331. Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Koyama M. Dynamics of immunoglobulins at the feto-maternal interface. *Rev Reprod.* 1999;4(2):81-9.
332. van den Berg JP, Westerbeek EA, Berbers GA, van Gageldonk PG, van der Klis FR, van Elburg RM. Transplacental transport of IgG antibodies specific for pertussis, diphtheria, tetanus, haemophilus influenzae type b, and Neisseria meningitidis serogroup C is lower in preterm compared with term infants. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29(9):801-5.
333. Lin FY, Philips JB, 3rd, Azimi PH, Weisman LE, Clark P, Rhoads GG, et al. Level of maternal antibody required to protect neonates against early-onset disease caused by group B Streptococcus type Ia: a multicenter, seroepidemiology study. *J Infect Dis.* 2001;184(8):1022-8.
334. Lin FY, Weisman LE, Azimi PH, Philips JB, 3rd, Clark P, Regan J, et al. Level of maternal IgG anti-group B streptococcus type III antibody correlated with protection of neonates against early-onset disease caused by this pathogen. *J Infect Dis.* 2004;190(5):928-34.
335. Aksu G, Genel F, Koturoğlu G, Kurugöl Z, Kütükçüler N. Serum immunoglobulin (IgG, IgM, IgA) and IgG subclass concentrations in healthy children: a study using nephelometric technique. *Turk J Pediatr.* 2006;48(1):19-24.
336. Xu D, Liu A, Wang X, Zhang M, Zhang Z, Tan Z, et al. Identifying suitable reference genes for developing and injured mouse CNS tissues. *Dev Neurobiol.* 2018;78(1):39-50.
337. Fassio A, Esposito A, Kato M, Saitsu H, Mei D, Marini C, et al. De novo mutations of the ATP6V1A gene cause developmental encephalopathy with epilepsy. *Brain.* 2018;141(6):1703-1718.
338. Helbig I, Lopez-Hernandez T, Shor O, Galer P, Ganesan S, Pendziwiat M, et al. A Recurrent Missense Variant in AP2M1 Impairs Clathrin-Mediated Endocytosis and Causes Developmental and Epileptic Encephalopathy. *Am J Hum Genet.* 2019;104(6):1060-1072.
339. Hamdan FF, Myers CT, Cossette P, Lemay P, Spiegelman D, Laporte AD, et al. High Rate of Recurrent De Novo Mutations in Developmental and Epileptic Encephalopathies. *Am J Hum Genet.* 2017;101(5):664-685.
340. Martin P, Reeder T, Sourbron J, de Witte PAM, Gammaitoni AR, Galer BS. An Emerging Role for Sigma-1 Receptors in the Treatment of Developmental and Epileptic Encephalopathies. *International journal of molecular sciences.* 2021;22(16):8416.
341. Motley A, Bright NA, Seaman MN, Robinson MS. Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J Cell Biol.* 2003;162(5):909-918.
342. Marcello E, Saraceno C, Musardo S, Vara H, de la Fuente AG, Pelucchi S, et al. Endocytosis of synaptic ADAM10 in neuronal plasticity and Alzheimer's disease. *J Clin Invest.* 2013;123(6):2523-38.
343. DeMari J, Mroske C, Tang S, Nimeh J, Miller R, Lebel RR. CLTC as a clinically novel gene associated with multiple malformations and developmental delay. *Am J Med Genet A.* 2016;170a(4):958-66.
344. Edvardson S, Cinnamon Y, Jalas C, Shaag A, Maayan C, Axelrod FB, et al. Hereditary sensory autonomic neuropathy caused by a mutation in dystonin. *Ann Neurol.* 2012;71(4):569-572.
345. Musante L, Püttmann L, Kahrizi K, Garshasbi M, Hu H, Stehr H, et al. Mutations of the aminoacyl-tRNA-synthetases SARS and WARS2 are implicated in the etiology of autosomal recessive intellectual disability. *Hum Mutat.* 2017;38(6):621-636.
346. Liu JJ, Ding J, Wu C, Bhagavatula P, Cui B, Chu S, et al. Retrolinkin, a membrane protein, plays an important role in retrograde axonal transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(7):2223-2228.
347. Wirkner U, Voss H, Ansoerge W, Pyerin W. Genomic organization and promoter identification of the human protein kinase CK2 catalytic subunit alpha (CSNK2A1). *Genomics.* 1998;48(1):71-78.
348. Ceglia I, Flajolet M, Rebholz H. Predominance of CK2 $\alpha$  over CK2 $\alpha'$  in the mammalian brain. *Mol Cell Biochem.* 2011;356(1-2):169-75.

349. Tse WT, Menninger JC, Yang-Feng TL, Francke U, Sahr KE, Lux SE, et al. Isolation and chromosomal localization of a novel nonerythroid ankyrin gene. *Genomics*. 1991;10(4):858-66.
350. Chun JJ, Shatz CJ. A fibronectin-like molecule is present in the developing cat cerebral cortex and is correlated with subplate neurons. *J Cell Biol*. 1988;106(3):857-572.
351. Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, Dilly KW, Guatimosim S, duBell WH, et al. Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature*. 2003;421(6923):634-9.
352. Feng Y, Chen MH, Moskowitz IP, Mendonza AM, Vidali L, Nakamura F, et al. Filamin A (FLNA) is required for cell-cell contact in vascular development and cardiac morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(52):19836-19841.
353. Hamdan FF, Srour M, Capo-Chichi JM, Daoud H, Nassif C, Patry L, et al. De novo mutations in moderate or severe intellectual disability. *PLoS Genet*. 2014;10(10):e1004772.
354. Li Y, Klena NT, Gabriel GC, Liu X, Kim AJ, Lemke K, et al. Global genetic analysis in mice unveils central role for cilia in congenital heart disease. *Nature*. 2015;521(7553):520-4.
355. Ma X, Adelstein RS. A point mutation in Myh10 causes major defects in heart development and body wall closure. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014;7(3):257-65.
356. Boyle L, Wamelink MMC, Salomons GS, Roos B, Pop A, Dauber A, et al. Mutations in TKT Are the Cause of a Syndrome Including Short Stature, Developmental Delay, and Congenital Heart Defects. *Am J Hum Genet*. 2016;98(6):1235-1242.
357. Tuzovic L, Yu L, Zeng W, Li X, Lu H, Lu HM, et al. A human de novo mutation in MYH10 phenocopies the loss of function mutation in mice. *Rare Dis*. 2013;1:e26144.
358. Ma X, Sung DC, Yang Y, Wakabayashi Y, Adelstein RS. Nonmuscle myosin IIB regulates epicardial integrity and epicardium-derived mesenchymal cell maturation. *J Cell Sci*. 2017;130(16):2696-2706.
359. Sasse P, Malan D, Fleischmann M, Roell W, Gustafsson E, Bostani T, et al. Perlecan is critical for heart stability. *Cardiovasc Res*. 2008;80(3):435-444.
360. Hortells L, Valiente-Alandi I, Thomas ZM, Agnew EJ, Schnell DJ, York AJ, et al. A specialized population of Periostin-expressing cardiac fibroblasts contributes to postnatal cardiomyocyte maturation and innervation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(35):21469-21479.
361. Yamamura Y, Furuichi K, Murakawa Y, Hirabayashi S, Yoshihara M, Sako K, et al. Identification of candidate PAX2-regulated genes implicated in human kidney development. *Sci Rep*. 2021;11(1):9123.
362. Faa G, Gerosa C, Fanni D, Monga G, Zaffanello M, Van Eyken P, et al. Morphogenesis and molecular mechanisms involved in human kidney development. *J Cell Physiol*. 2012;227(3):1257-68.
363. Weir MR, Dzau VJ. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am J Hypertens*. 1999;12(12 Pt 3):205s-213s.
364. Gribouval O, Gonzales M, Neuhaus T, Aziza J, Bieth E, Laurent N, et al. Mutations in genes in the renin-angiotensin system are associated with autosomal recessive renal tubular dysgenesis. *Nat Genet*. 2005;37(9):964-8.
365. El Kares R, Manolescu DC, Lakhal-Chaieb L, Montpetit A, Zhang Z, Bhat PV, et al. A human ALDH1A2 gene variant is associated with increased newborn kidney size and serum retinoic acid. *Kidney Int*. 2010;78(1):96-102.
366. Li JY, Paragas N, Ned RM, Qiu A, Viltard M, Leete T, et al. Scara5 is a ferritin receptor mediating non-transferrin iron delivery. *Dev Cell*. 2009;16(1):35-46.
367. Kim HT, Yin W, Jin YJ, Panza P, Gunawan F, Grohmann B, et al. Myh10 deficiency leads to defective extracellular matrix remodeling and pulmonary disease. *Nat Commun*. 2018;9(1):4600.
368. Geyer PE, Kulak NA, Pichler G, Holdt LM, Teupser D, Mann M. Plasma Proteome Profiling to Assess Human Health and Disease. *Cell Syst*. 2016;2(3):185-95.
369. Cox J, Mann M. Quantitative, high-resolution proteomics for data-driven systems biology. *Annu Rev Biochem*. 2011;80:273-99.
370. Altelaar AF, Heck AJ. Trends in ultrasensitive proteomics. *Curr Opin Chem Biol*. 2012;16(1-2):206-13.

371. Müller-Reif JB, Hansen FM, Schweizer L, Treit PV, Geyer PE, Mann M. A New Parallel High-Pressure Packing System Enables Rapid Multiplexed Production of Capillary Columns. *Mol Cell Proteomics*. 2021;20:100082.
372. Cao Z, Tang HY, Wang H, Liu Q, Speicher DW. Systematic comparison of fractionation methods for in-depth analysis of plasma proteomes. *J Proteome Res*. 2012;11(6):3090-100.
373. Sielaff M, Kuharev J, Bohn T, Hahlbrock J, Bopp T, Tenzer S, et al. Evaluation of FASP, SP3, and iST Protocols for Proteomic Sample Preparation in the Low Microgram Range. *J Proteome Res*. 2017;16(11):4060-4072.
374. Zander J, Bruegel M, Kleinhempel A, Becker S, Petros S, Kortz L, et al. Effect of biobanking conditions on short-term stability of biomarkers in human serum and plasma. *Clin Chem Lab Med*. 2014;52(5):629-39.
375. Bowen CL, Hemberger MD, Kehler JR, Evans CA. Utility of dried blood spot sampling and storage for increased stability of photosensitive compounds. *Bioanalysis*. 2010;2(11):1823-1828.
376. Li W, Tse FL. Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. *Biomed Chromatogr*. 2010;24(1):49-65.
377. Freydanck MK, Laubender RP, Rack B, Schuhmacher L, Jeschke U, Scholz C. Two-marker combinations for preoperative discrimination of benign and malignant ovarian masses. *Anticancer Res*. 2012;32(5):2003-2008.
378. Panebianco F, Mazzanti C, Tomei S, Aretini P, Franceschi S, Lessi F, et al. The combination of four molecular markers improves thyroid cancer cytologic diagnosis and patient management. *BMC Cancer*. 2015;15:918.
379. Su YL, Huang HL, Huang BS, Chen PC, Chen CS, Wang HL, et al. Combination of OipA, BabA, and SabA as candidate biomarkers for predicting *Helicobacter pylori*-related gastric cancer. *Sci Rep*. 2016;6:36442.
380. Etzioni R, Kooperberg C, Pepe M, Smith R, Gann PH. Combining biomarkers to detect disease with application to prostate cancer. *Biostatistics*. 2003;4(4):523-38.
381. Duffy MJ, Sturgeon CM, Söletormos G, Barak V, Molina R, Hayes DF, et al. Validation of new cancer biomarkers: a position statement from the European group on tumor markers. *Clin Chem*. 2015;61(6):809-20.

## 8 Anhang

### 8.1 Zusätzliche Tabellen und Abbildungen

#### 8.1.1 Kohortenübersicht

	Phase 1		Phase 2		Phase 3		Phase 1-3	
	Rekrutierung	Einwilligung	Rekrutierung	Einwilligung	Rekrutierung	Einwilligung	Rekrutierung	Einwilligung
<b>Reifgeborene</b>	0	0	51	88	11	83	21	86
<b>Frühgeborene</b>	<b>30</b>	<b>84</b>	<b>73</b>	<b>93</b>	<b>33</b>	<b>93</b>	<b>45</b>	<b>90</b>
< 28 SSW	94	100	100	100	80	100	<b>91</b>	<b>100</b>
28-32 SSW	78	92	64	67	88	100	<b>77</b>	<b>86</b>
≥ 32 SSW	18	72	71	95	12	75	<b>34</b>	<b>81</b>

Ergänzende Tabelle 1: Rekrutierung und Einwilligung zur Studienteilnahme (Angabe in %)

Blutproben N	Phase 1	Phase 2	Phase 3	Gesamt
<b>Reifgeborene, N</b>	0	535	31	566
<b>Frühgeborene, N</b>	<b>85</b>	<b>162</b>	<b>42</b>	<b>289</b>
< 28 SSW, N	18	28	12	<b>58</b>
28-32 SSW, N	31	20	24	<b>75</b>
≥ 32 SSW, N	36	114	6	<b>156</b>

Ergänzende Tabelle 3: Übersicht Blutproben nach Phasen

#### 8.1.2 Klinische Daten

##### 8.1.2.1 Basisdaten der Neugeborenen

	Reifgeborene	Frühgeborene	ExtFG	SehrFG	SpätFG
Gestationsalter	≥ 37 SSW	< 37 SSW	< 28 SSW	28-32 SSW	≥ 32 SSW
Anzahl	492	161	28	36	97
<b>Gewichtsklassifizierung</b>					
GG < 1500 g (VLBW), N (%)	0 (0)	62 (39)	28 (100)	28 (78)	6 (6)
GG < 1000 g (ELBW), N (%)	0 (0)	33 (21)	26 (93)	6 (17)	1 (1)
SGA (GG < 10. Perz.), N (%)	49 (10)	20 (12)	6 (21)	2 (6)	12 (12)
LGA (GG > 90. Perz.), N (%)	25 (5)	6 (4)	1 (4)	1 (3)	4 (4)
<b>Geburtsmodus</b>					
Vaginale Geburt	377 (77)	61 (38)	6 (21)	9 (25)	46 (47)
Spontangeburt, N (%)	238 (48)	43 (27)	6 (21)	9 (25)	28 (29)
Medizin. Einleitung, N (%)	63 (13)	7 (4)	0 (0)	0 (0)	7 (7)
VE oder Forceps, N (%)	76 (15)	11 (7)	0 (0)	0 (0)	11 (11)
Sectio N (%)	115 (23)	100 (62)	22 (79)	27 (75)	51 (53)

Ergänzende Tabelle 4a: Anthropometrische Daten der Neugeborenen

	ExtFG vs RG	SehrFG vs RG	SpätFG vs RG	FG vs RG	Ext vs Sehr	Sehr vs Spät	Ext vs Spät
<b>GA (Wochen)</b>	****	****	****	****	****	****	****
<b>Weiblich</b>	ns	****	**	****	ns	*	ns
<b>Geburtsgewicht (g)</b>	****	****	****	****	****	****	****
<b>Körperlänge (cm)</b>	****	****	****	****	****	****	****
<b>Kopfumfang (cm)</b>	****	****	****	****	****	****	****
<b>APGAR Score 1</b>	****	****	****	****	ns	**	****
<b>APGAR Score 5</b>	****	****	****	****	ns	**	****
<b>APGAR Score 10</b>	****	****	****	****	ns	**	****
<b>Mehrlings-SS</b>	****	****	****	****	ns	ns	ns
<b>Sectio</b>	****	****	****	****	ns	*	*

**Ergänzende Tabelle 4b: Anthropometrische Daten- Vergleich der Untergruppen.** Der Vergleich der genannten Untergruppen erfolgte mittels T-Test bzw. Mann-Whitney-U-Test (numerische Daten) und Fisher's exact-Test (kategorische Daten) (\*\*\*\* p ≤0,0001, \*\*\* p ≤0,001, \*\* p ≤0,01, \* p ≤0,05, ns= Nicht signifikant).

	Reifgeborene	Frühgeborene	ExtFG	SehrFG	SpätFG
Gestationsalter	≥ 37 SSW	< 37 SSW	< 28 SSW	28-32 SSW	≥ 32 SSW
Anzahl	492	161	28	36	97
Pneumothorax, N (%)	4 (0,8)	9 (6)	7 (25)	1 (3)	1 (1)
Abnormaler ABR, N (%)	17 (4)	5 (3)	2 (7)	1 (3)	2 (2)
<b>Metabolische Erkrankung</b>					
Ikterus N (%)	14 (3)	72 (45)	19 (68)	22 (61)	31 (32)
Hyperbilirubinämie, N (%)	1 (0,2)	22 (14)	5 (18)	11 (31)	6 (6)
Blutzuckerentgleisungen, N (%)	45 (9)	36 (22)	8 (29)	3 (8)	25 (26)
Hypo/Hyperglycämie (N/N)	43/2	28/8	1/7	3/0	24/1

**Ergänzende Tabelle 5a: Erkrankungen der Neugeborenen**

	ExtFG vs RG	SehrFG vs RG	SpätFG vs RG	FG vs RG	Ext vs Sehr	Sehr vs Spät	Ext vs Spät
<b>Asphyxie</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>Infektion</b>	****	ns	****	****	****	ns	****
Vermutete Infektion							
<b>Kardiovaskulär</b>	****	****	ns	****	***	***	****
Hypo-/ Hypertension	****	***	ns	****	ns	ns	**
ASD oder PFO	****	**	ns	****	ns	**	**
VSD	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PDA	****	**	ns	****	****	**	****
<b>Hämatologisch</b>	****	****	****	****	****	ns	****
Thrombozytopenie	****	***	**	****	*	ns	***
Anämie	****	****	ns	****	****	***	****
Polyglobulie	ns	ns	*	*	ns	ns	ns
Gerinnungsstörung (excl. Hered. Gerinnungst.)	ns	**	ns	****	ns	ns	**
<b>Respiratorisch</b>	****	****	****	****	ns	****	****
RDS	****	****	****	****	ns	****	****
Respiratorisches Versagen	****	****	****	****	*	***	****

Apnoe	****	****	****	****	ns	****	****
BPD, jeden Grades	****	***	ns	****	***	*	****
Pneumothorax	****	ns	ns	***	*	ns	****
<b>Neurologisch</b>	****	****	***	****	ns	***	***
ICH, jeden Grades	****	****	*	****	ns	*	****
PVE, jeden Grades	****	*	ns	****	*	ns	***
HIE	ns						
Abnormaler ABR	ns						
<b>ROP, jeden Gades</b>	****	***	ns	****	****	*	****

**Ergänzende Tabelle 5b: Erkrankungen- Vergleich der Untergruppen.** Der Vergleich der genannten Untergruppen erfolgte mittels T-Test bzw. Mann-Whitney-U-Test (numerische Daten) und Fisher's exact-Test (kategorische Daten) (\*\*\*\* p ≤0,0001, \*\*\* p ≤0,001, \*\* p ≤0,01, \* p ≤0,05, ns= Nicht signifikant).

	Reifgeborene	Frühgeborene	ExtFG	SehrFG	SpätFG
<b>Gestationsalter</b>	≥ 37 SSW	< 37 SSW	< 28 SSW	28-32 SSW	≥ 32 SSW
Anzahl	492	161	28	36	97
<b>Antibiotika, N (%)</b>	78 (16)	115 (71)	28 (100)	34 (94)	53 (55)
Antimykotika (Prophylaxe), N (%)	75 (15)	112 (70)	27 (96)	34 (94)	51 (53)
<b>Blut-Transfusionen, N (%)</b>	1 (0,2)	20 (12)	14 (50)	4 (11)	2 (2)
EK, N (%)	1 (0,2)	18 (11)	14 (50)	3 (8)	1 (1)
TK, N (%)	1 (0,2)	4 (3)	3 (11)	0 (0)	1 (1)
FFP, N (%)	1 (0,2)	5 (3)	4 (14)	1 (3)	0 (0)
<b>Beatmungsunterstützung, N (%)</b>	34 (7)	107 (67)	28 (100)	35 (97)	44 (45)
Invasive Beatmung, N (%)		18 (11)	14 (50)	4 (11)	1 (1)
<b>Surfactant, N (%)</b>	2 (0,4)	52 (32)	27 (96)	22 (61)	3 (3)
<b>RDS-Prophylaxe, N (%)</b>	6 (1,2)	102 (63)	23 (82)	33 (92)	46 (47)
Unbekannt RDS, N (%)	10 (2)	7 (4)	3 (11)	0 (0)	4 (4)

**Ergänzende Tabelle 6: Therapie der Neugeborenen**

### 8.1.2.2 Basisdaten der Eltern

	RG	FG	ExtFG	SehrFG	SpätFG
<b>Gestationsalter</b>	≥ 37 SSW	< 37 SSW	< 28 SSW	28-32 SSW	≥ 32 SSW
Anzahl der Mütter	484	128	24	27	77
*Fragebogen	461	66	6	9	51
<b>*Größe (m) Mutter, M (SD)</b>	1,68 (0,06)	1,67 (0,07)	1,67 (0,07)	1,68 (0,08)	1,66 (0,08)
<b>*Vater, M (SD)</b>	1,80 (0,1)	1,80 (0,1)	1,80 (0,1)	1,80 (0,1)	1,80 (0,1)
<b>*Gewicht (kg) vor SS, M (SD)</b>	63,4 (10)	63,6 (13)	64,4 (12)	65,0 (17)	63,2 (13)
Gewicht (kg) bei EU, M (SD)	64,5 (11)	65,1 (13)	68,3 (16)	66,5 (12)	63,5 (13)
Gewicht (kg) bei Geburt, M (SD)	78,5 (12)	75,8 (14)	73,9 (17)	79,0 (15)	75,3 (14)

*Vater, M (SD)	83,4 (12)	83,0 (12)	74,8 (8)	86,4 (15)	83,2 (12)
----------------	-----------	-----------	----------	-----------	-----------

**Ergänzende Tabelle 7: Basisdaten der Eltern**

### 8.1.2.3 Schwangerschaft

	Reifgeborene	Frühgeborene	ExtFG	SehrFG	SpätFG
Gestationsalter	≥ 37 SSW	< 37 SSW	< 28 SSW	28-32 SSW	≥ 32 SSW
Anzahl Neugeborene	492	161	28	36	97
Anzahl der Mütter	484	128	24	27	77
*Fragebogen	461	66	6	9	51
Oligohydramnion, N (%)	13 (3)	20 (12)	8 (29)	5 (14)	7 (7)
Polyhydramnion, N (%)	9 (2)	6 (4)	0 (0)	3 (8)	3 (3)
Blutung während SS, N (%)	10 (2)	13 (8)	3 (11)	5 (14)	5 (5)
Vorzeitige Wehen, N (%)	6 (1)	73 (45)	20 (71)	21 (58)	32 (33)
Vorzeitiger Blasensprung, N (%)	124 (27)	76 (47)	11 (39)	15 (42)	50 (52)
Isthmozervikale Insuffizienz, N (%)	6 (1)	17 (11)	5 (18)	7 (19)	5 (5)
Schnelle Schwangerschaftsfolge, N (%)	2 (0,4)	2 (1)	1 (4)	1 (3)	0 (0)
Maternale Infektion als Entbindungsgrund, N (%)	0 (0)	7 (4)	3 (11)	1 (3)	3 (3)
Keine Angabe, N (%)	6 (1)	3 (2)	0 (0)	2 (6)	1 (1)

**Ergänzende Tabelle 11: Schwangerschaft** (Mehrlingsschwangerschaften gingen jeweils mehrfach ein.)

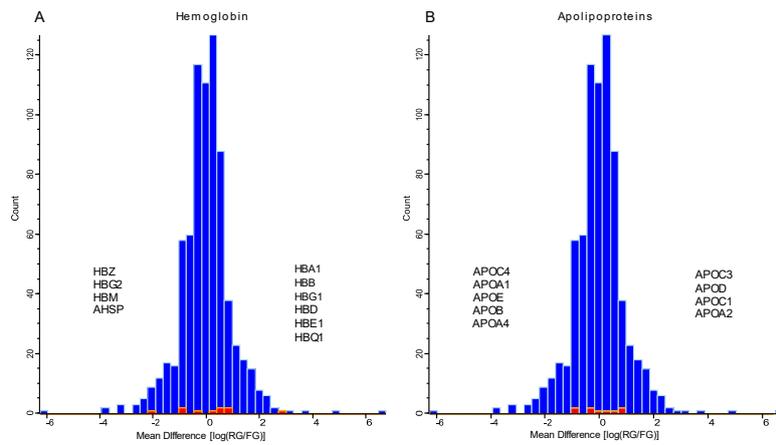
### 8.1.3 Proteom Daten

#### 8.1.3.1 Übersicht über gewonnene Blutproben

Blutproben N	ALLE	Reifgeborene	Frühgeborene	ExtFG	SehrFG	SpätFG
<b>N Neugeborene</b>	823	501	161	28	36	97
<b>Geburt</b> (h)(SD)	4 (6)	8 (8)	2 (4)	3 (6)	2 (4)	1 (2)
<b>NGS</b> (h)(SD)	46 (8)	46 (8)	44 (7)	53 (11)	42 (9)	44 (6)
<b>NGS 32+0</b> (d)(SD)	30 (16)	-	30 (16)	43 (10)	29 (1)	-
<b>Entlassung</b> (d)(SD)	22 (29)	4 (2)	34 (32)	74 (20)	46 (17)	9 (6)

**Ergänzende Tabelle 12: Durchschnittliche Zeit der Blutentnahme zu den 4 Hauptabnahmezeitpunkten**

### 8.1.3.2 Basisdaten der massenspektrometrischen Auswertung



#### Ergänzende Abbildung 1: Histogramm Hämoglobin (A) und Apolipoproteine (B)

Die blaue Farbe zeigt alle Proteine des Vergleichs von Reif- und Frühgeborenen über alle 4 Zeitpunkte. In rot ist der Anteil der Proteine mit der GO-Annotierung „hemoglobin“ (A) bzw. „apolipoprotein“ (B) markiert.

## 8.2 Einwilligungserklärung



CAMPUS INNENSTADT | PERINATALZENTRUM  
NEONATOLOGIE DER KINDERKLINIK  
AN DER FRAUENKLINIK MAISTRASSE



# PROTEOM-Studie bei Neu- und Frühgeborenen

## Informationsschrift und Einwilligungserklärung

### Eltern

#### STUDIENLEITER

**Prof. Dr. med. Orsolya Genzel-Boroviczény**  
Perinatalzentrum – Neonatologie der Kinderklinik  
Dr. von Haunersches Kinderspital  
Kinderklinik und Kinderpoliklinik der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Maistraße 11  
80337 München  
Tel.: 089-4400-54535  
E-Mail: genzel@med.uni-muenchen.de

Sehr geehrte Eltern,

wir bitten Sie um die Teilnahme Ihres Kindes an der Proteom-Studie. Die folgenden Seiten sollen Sie über unsere Studie informieren und darüber, was eine Teilnahme für Sie und Ihr Kind bedeuten würde. Nachdem Sie dieses Schreiben gelesen und mit Ihrem Partner besprochen haben, können Sie sich frei entscheiden, ob Sie teilnehmen möchten.

#### **Warum interessieren wir uns für Proteine?**

Proteine erfüllen im menschlichen Körper die vielfältigsten Funktionen. Es wird immer deutlicher, dass unser Körper auf bestimmte Zustände oder Krankheiten sogar mit „Schutz-Proteinen“ reagieren kann. Zum Proteom von Neugeborenen liegen aber noch kaum Daten vor.

#### **Warum fragen wir Sie?**

Ziel unserer Studie ist es, Zusammenhänge zwischen Erkrankungen – seien sie nun metabolischen, neurologischen, allergischen oder sonstigen Ursprungs – und der Zusammensetzung der Proteine im Blut von Neugeborenen zu finden. Jedes Ergebnis soll mit der Blutzusammensetzung gesunder Neugeborener bzw. Neugeborener ohne familiäre Vorbelastung verglichen werden. Es werden daher sowohl gesunde wie weniger gesunde Kinder als Teilnehmer benötigt.

#### **Die Teilnahme ist freiwillig!**

Ihre Teilnahme und die Ihres Kindes ist freiwillig. Sie können jederzeit, auch ohne Angabe von Gründen, die Teilnahme widerrufen, ohne dass Ihrem Kind oder Ihnen dadurch irgendwelche Nachteile für die weitere ärztliche Versorgung entstehen würden. Einen Widerruf der Einwilligung bzw. den Rücktritt von der Studie müssten Sie nicht begründen. Im Falle eines Widerrufs werden die bis zu diesem Zeitpunkt erhobenen Daten irreversibel anonymisiert, sodass keine Rückschlüsse auf Ihr Kind mehr möglich sind.

#### **Wie läuft die Studie ab?**

Im Rahmen der Studie erfolgen keine zusätzlichen Blutentnahmen oder Interventionen. Es werden lediglich im Rahmen von routinemäßigen Blutabnahmen 1-2 zusätzliche Blutstropfen entnommen. Schon anhand dieser kleinen Menge Blut kann eine enorme Zahl an Proteinen im Blut Ihres Kindes bestimmt werden. Dabei untersuchen wir:

- 1. Bei gesunden Neugeborenen: 1-2 Blutstropfen beim Neugeborenen-Screening*
- 2. Bei Frühgeborenen: 1-2 Blutstropfen im Rahmen klinisch notwendiger Blutabnahmen am 1. Lebenstag, beim Neugeborenen-Screening und vor Entlassung*
- 3. Bei Kindern mit Asphyxie: 1-2 Blutstropfen im Rahmen klinisch notwendiger Blutabnahmen am 1. und 2. Lebenstag*
- 4. Bei Kindern mit Infektionen: 1-2 Blutstropfen, abgenommen vor sowie 48h nach Behandlungsbeginn im Rahmen klinisch notwendiger Blutabnahmen*

#### **Welche Daten werden erhoben?**

Im Rahmen der Studie sollen auch Daten zum Gesundheitszustand Ihres Kindes erhoben werden. Dies wären u.a. die Diagnose, Laborwerte, sowie eben die Zusammensetzung der Blut-Proteine. Zusätzlich bitten wir Sie als Eltern, einige Fragen zu Ihrem eigenen Gesundheitszustand und dem von engen Familienangehörigen zu beantworten. Diese Daten werden mit einer fortlaufenden Nummer pseudonymisiert und in einer Datenbank gesammelt.

**Gibt es irgendwelche Risiken?**

Da es sich bei der Studie um eine reine Datenerfassung anhand der gesammelten Blutstropfen handelt, bestehen keine studienspezifischen Risiken. Zusätzliche Blutentnahmen nur zum Zwecke dieser Studie wird es nicht geben, lediglich die Entnahme der je 1-2 zusätzlichen Blutstropfen bei ohnehin anstehenden Blutentnahmen.

**Gibt es irgendwelche Vorteile?**

Sie oder Ihr Kind werden keinen unmittelbaren persönlichen Nutzen aus dieser Studie ziehen. Die Studie möchte dazu beitragen, im Allgemeinen mehr über mögliche Schutzfunktionen von Proteinen und deren Zusammenhang mit Erkrankungen unterschiedlicher Art herauszufinden. Dies könnte aber in Zukunft möglicherweise die Behandlung von Patienten mit vergleichbaren Erkrankungen verbessern.

**Wer kann die persönlichen Daten Ihres Kindes einsehen?**

Die zusammengetragenen Studienergebnisse werden streng vertraulich behandelt. Unsere Datenbank wird nur auf den geschützten Rechnern des Klinikums der Universität München gespeichert. Ausschließlich Studienbefugte, also Ihre behandelnden Ärzte, die Studienleitung und die Doktoranden, haben Zugriff auf diese verschlüsselten Daten.

Ihre persönlichen Daten oder die Ihres Kindes werden nie in irgendeiner Form veröffentlicht oder weitergegeben werden. Diejenigen Daten, die keinen Rückschluss auf Ihr Kind zulassen, werden gemeinsam von der Studiengruppe ausgewertet. Im Falle eines Widerrufs Ihrer Einwilligungserklärung würde eine irreversible Anonymisierung aller Daten erfolgen, sodass definitiv keine Rückschlüsse mehr auf Ihr Kind möglich sind – nicht einmal mehr für die Mitglieder der Studiengruppe.

**Wie lange werden die Daten Ihres Kindes aufgehoben?**

Die Behandlungsakten Ihres Kindes werden entsprechend der gesetzlichen Bestimmungen verwahrt, unabhängig von einer Teilnahme an der Studie. Die Unterlagen speziell zu dieser Studie werden nach Abschluss der Kohortenstudie 10 Jahre verwahrt und dann irreversibel anonymisiert.

**Gibt es ein Follow-Up?**

Bei unserer Studie gibt es kein klassisches Follow-Up. D.h., dass es nach Ihrem Krankenhausaufenthalt keine weiteren Termine, Untersuchungen, Blutentnahmen o.Ä. als Verlaufsbeobachtung geben wird. Wir bitten Sie dennoch um Ihre Erlaubnis, Sie unter Umständen kontaktieren zu dürfen, um Sie in knapper Form zur Entwicklung Ihres Kindes zu befragen.

**Gibt es einen speziellen Versicherungsschutz?**

Für die Studie besteht keine Patientenversicherung, da im Rahmen der Studie keine Intervention erfolgt.

**Bei offen gebliebenen Fragen können Sie sich gerne jederzeit an uns wenden!**

**Datenschutz**

Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Es werden persönliche Daten erhoben, gespeichert und verschlüsselt (pseudonymisiert) ausgewertet, d.h. weder der Name noch die Initialen oder das Geburtsdatum erscheinen im Verschlüsselungscode.

Im Falle des Widerrufs Ihrer Einwilligung bzw. 10 Jahre nach Abschluss der Kohortenstudie werden die gespeicherten Daten irreversibel anonymisiert und die Originalunterlagen vernichtet.

Eine Entschlüsselung erfolgt lediglich in Fällen, in denen es die Sicherheit Ihres Kindes erfordert („medizinische Gründe“) oder falls es zu Änderungen in der wissenschaftlichen Fragestellung kommt („wissenschaftliche Gründe“).

Sie haben jederzeit die Möglichkeit, Auskunft über die Ihr Kind betreffenden personenbezogenen Daten zu erhalten sowie ggf. deren Berichtigung oder Löschung zu verlangen.

Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit der persönlichen Daten gewährleistet.

Bei Beschwerden bzgl. des Datenschutzes haben Sie die Möglichkeit, sich an die Datenschutzaufsichtsbehörde zu wenden.

**Datenschutzverantwortliche:**

Datenschutzbeauftragter zentral:  
Gerhard Mayer, Behördlicher  
Datenschutzbeauftragter,  
Pettenkoferstrasse 8, 80336 München  
Tel. 089/4400-58454, Fax -58452  
datenschutz@med.uni-muenchen.de

Datenschutzaufsichtsbehörde:  
Prof. Dr. T. Petri, Bayerische Landesbeauftragte  
für den Datenschutz  
Postfach 22 12 19, 80502 München  
Wagmüllerstraße 18, 80538 München  
Tel. 089 212672-0, Fax 089 212672-50  
poststelle@datenschutz-bayern.de

Datenschutzbeauftragter lokal:  
Prof. Dr. Johannes Hübner  
Dr. von Haunersches Kinderspital  
Johannes.huebner@med.uni-muenchen.de



CAMPUS INNENSTADT | PERINATALZENTRUM  
NEONATOLOGIE DER KINDERKLINIK  
AN DER FRAUENKLINIK MAISTRASSE



## Einwilligungserklärung

### PROTEOM-Studie bei Neu- und Frühgeborenen

Wir wurden gebeten, dass unser Kind an der Proteom-Studie zur Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen der Protein-Zusammensetzung im Blut unseres Kindes mit verschiedenen Erkrankungen teilnimmt. Der Zweck der Teilnahme wurde uns erklärt. Wir wurden über mögliche Vorteile und Risiken einer Teilnahme informiert. Wir hatten Gelegenheit, Fragen zu dem Projekt zu stellen und haben auf diese ausreichend Antworten bekommen. Wir sind uns bewusst, dass unsere Teilnahme freiwillig ist und wir jederzeit ohne besondere Begründung unsere Zustimmung widerrufen können. Daraus entsteht uns und insbesondere unserem Kind kein Nachteil. Die Ethikkommission des Fachbereiches Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität hat der Durchführung zugestimmt.

Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Es werden persönliche Daten und Befunde erhoben, gespeichert und in pseudo-nymisierter Form nach Maßgabe der Patientenaufklärung ausgewertet.

Wir/Ich, \_\_\_\_\_ (Name/n)

- sind/bin mit der Erhebung und Verwendung persönlicher Daten und Befunddaten nach Maßgabe der Patienteninformation einverstanden und nehme/n an der Studie teil.
- lehne/n die Teilnahme ab.

Name des Kindes	
Geburtsdatum: (T)   ____   (M)   ____   (J)   ____	
Name der Mutter	Unterschrift der Mutter
	Datum (heute): (T)   ____   (M)   ____   (J)   ____
Name des Vaters	Unterschrift des Vaters
	Datum (heute): (T)   ____   (M)   ____   (J)   ____
Name der Person, die das Aufklärungsgespräch geführt hat	Unterschrift der aufklärenden Person
	Datum (heute): (T)   ____   (M)   ____   (J)   ____

### 8.3 Fragebogen

Im Folgenden ist ein für diese Arbeit relevanter Auszug des Fragebogens gezeigt.

#### Gynäkologische Fragen

1. Wie viel haben Sie vor Beginn der Schwangerschaft gewogen? ..... kg
2. In welchem Alter hatten Sie das erste Mal Ihre Menstruationsblutung? ..... Jahre
3. Wie lange dauert Ihr durchschnittlicher Zyklus (vom 1. Tag Ihrer Regelblutung bis zum 1. Tag der nächsten Regelblutung)? ..... Tage
4. Haben Sie die **Pille** eingenommen?  
Ja  Für wie lange? ..... Jahre  
Einnahme wurde beendet vor: ..... Jahr(en)  
Nein  Name des zuletzt verwendeten Präparats: .....
5. Haben Sie **andere** hormonelle oder pharmakologische Verhütungsmaßnahmen angewendet?  
Ja  Für wie lange? ..... Jahre  
Art der Verhütungsmethode .....  
Nein
6. Hatten Sie bereits relevante **gynäkologische Voroperationen**?  
Ja  Welche? .....  
Wie viele? .....  
Nein

#### Überblick Schwangerschaften

(War dies Ihre allererste Schwangerschaft überhaupt? Ja?  Dann können Sie dieses Kapitel überspringen.)

1. Waren unter allen Ihren bisherigen Schwangerschaften auch Zwillings- bzw. Drillings- oder Vierlings-Geburten?  
Ja  ..... Zwillingengeburt ..... Drillingsgeburt ..... Vierlingsgeburt  
Nein
2. Wie viele Ihrer Kinder kamen **zu früh** auf die Welt (vor der 37. Schwangerschaftswoche, einschließlich Ihres gerade geborenen Kindes)?  
..... Frühgeburten Keine
3. Wie haben Sie Ihre Kinder geboren (einschließlich Ihres gerade geborenen Kindes)?  
Anzahl Spontangeburt ..... Zangengeburt/Vakuumentextraktionen ..... Kaiserschnitte .....

[4]

4. Hatten Sie bereits einen Abort, eine stille Geburt oder eine Bauchhöhlenschwangerschaft?
- Ja  Anzahl ..... Abort ..... Stille Geburt ..... Bauchhöhlenschw.  
 Nein

5. Falls es leibliche Geschwister gibt, wie viele? ..... Mädchen ..... Jungen

6. Leidet eines bzw. mehrere dieser Geschwister an einer von einem Arzt diagnostizierten Grunderkrankung? (Wenn keine Geschwister, überspringen Sie Frage 6)

Allergie / Unverträglichkeit	Ja <input type="checkbox"/>	Welche? .....
	Nein <input type="checkbox"/>	Bei wem? .....
Asthma	Ja <input type="checkbox"/>	Bei wem? .....
	Nein <input type="checkbox"/>	
Neurodermitis	Ja <input type="checkbox"/>	Bei wem? .....
	Nein <input type="checkbox"/>	
Diabetes	Ja <input type="checkbox"/>	Typ 1 <input type="checkbox"/> Bei wem? .....
	Nein <input type="checkbox"/>	Typ 2 <input type="checkbox"/>
Erbkrankheiten	Ja <input type="checkbox"/>	Welche? .....
	Nein <input type="checkbox"/>	Bei wem? .....
Andere	Ja <input type="checkbox"/>	Welche? .....
	Nein <input type="checkbox"/>	Bei wem? .....

### Reproduktionsmedizin

1. Haben Sie bei diesem Kind medizinische Hilfe in Anspruch genommen, um schwanger zu werden?

Nein  (Wenn nein, können Sie dieses Kapitel überspringen)

Ja   Gesamtzahl Versuche/eingesetzte Embryonen

<input type="checkbox"/> Ausschließlich Hormontherapie	...../.....
<input type="checkbox"/> In-vitro- Fertilisation (IVF)	...../.....
<input type="checkbox"/> Intra-zytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI)	...../.....
<input type="checkbox"/> Testikuläre Spermienextraktion mit ICSI (TESE)	...../.....
<input type="checkbox"/> Mikrochir. epididymale Spermatozoenaspersion mit ICSI (MESA)	...../.....

2. Falls eine Form der künstlichen Befruchtung stattgefunden hat, stammte der Samen von Ihrem Mann?

Ja  Nein, von einem Spender  Keine künstliche Befr.

3. Haben Sie im Rahmen der Maßnahmen eine Hormontherapie erhalten?

Ja  Welche? / Name des Präparats .....

Nein

4. Hat der Vater des Kindes im Rahmen der Maßnahmen eine Hormontherapie erhalten?

Ja  Welche? / Name des Präparats .....

Nein

[5]

## Allgemeine Fragen

Die Fragen 1-4 beziehen sich v.a. auf Ihre ethnische **Abstammung**, weniger auf Ihre Staatsangehörigkeit.

(wenn immer gleich, gerne Abkürzungen verwenden)

mütter-  
licherseits

1. In welchem Land wurden **Sie** geboren? Mutter .....
2. In welchem Land wurden Ihre **Eltern** geboren? Großmutter .....  
Großvater .....

väter-  
licherseits

3. In welchem Land wurde der **Vater** des Kindes geboren? Vater .....
4. In welchem Land wurden die **Eltern** des Vaters geboren? Großmutter .....  
Großvater .....

5. Was sind Sie von **Beruf**?

Mutter ..... Vater .....

6. Welchen **Bildungsweg** haben Sie genommen?

	Mutter	Vater
Kein Schulabschluss	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mittelschule	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mittlere Reife	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(Fach-)Abitur	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
(Fach-)Hochschule, Universität	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Anderer Bildungsweg	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

## Fragen zum Vater

1. Größe des Vaters ..... , ..... m
2. Gewicht des Vaters ..... kg
3. Alter des Vaters ..... Jahre

## Abschlussfrage

Wenn Sie die hinter Ihnen liegende Schwangerschaft auf einer Skala von 1 („keine Belastung“) bis 10 („unerträgliche Belastung“) bewerten müssten, welche Punktzahl würden Sie vergeben? .....

## Nachwort

Wir möchten uns herzlich für Ihre Geduld und Gewissenhaftigkeit bei der Beantwortung unseres Fragebogens bedanken. Ihnen und Ihrem neuen Familienmitglied wünschen wir von Herzen alles Gute für Ihre gemeinsame Zukunft!

Optional: Ihre E-mail-Adresse für evtl. Rückfragen: .....

Möchten Sie in ca. 2 Jahren per E-Mail über Ergebnisse unserer Studie informiert werden? Ja  Nein

## 9 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Orsolya Genzel-Boroviczeny für die Überlassung des Themas bedanken. Vielen Dank, dass sie mir dieses Projekt ermöglicht haben, von jedem Ende der Welt stets für Fragen und Anregungen erreichbar waren und auch darüber hinaus mit Rat und Tat zur Seite stehen.

Weiterhin danke ich Frau Dr. med. Susanne Pangratz-Führer, die stets ein offenes Ohr für mich hatte und die Studiendurchführung koordinierte.

Danken möchte ich ebenfalls Dr. Johannes Müller-Reif sowie Dr. Philipp Geyer aus dem MPI für Biochemie, München für ihre unermüdete Hilfe und insbesondere Geduld bei jeglichen technischen, wissenschaftlichen oder statistischen Fragestellungen. Vielen Dank, dass ihr jederzeit als Ansprechpartner bereitstandet.

Weiterhin möchte ich meinen „Mitstreitern“ Janne Scharpenack und Wolfgang Bodensohn für die gemeinsamen Stunden in der Klinik bei der Patientenrekrutierung und Datenerhebung danken.

Ein großer Dank geht auch an die Schwestern und Ärzte der neonatologischen Intensivstation und dem Allgemeinen Kinderzimmer des Perinatalzentrums in der Maistraße. Ohne eure Hilfe und tatkräftige Unterstützung wäre eine Probensammlung in dem großen Rahmen erst gar nicht möglich gewesen.

Ganz besonders möchte ich mich auch für das Vertrauen und Interessen der Eltern unserer kleinen Patienten bedanken.

Nicht zuletzt gilt ein besonderer Dank meiner gesamten Familie, insbesondere meinen Eltern und Geschwistern. Ich danke euch aus ganzem Herzen für eure ständige Unterstützung nicht nur im Rahmen der Doktorarbeit oder meines ganzen Studiums, sondern weit darüber hinaus. Ihr wart und seid immer für mich da!

## 10 Affidavit

Eisenburger, Robin Tamara

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

**Charakterisierung des Proteoms Frühgeborener anhand von Trockenblutproben mit Fokus auf die postnatale und gestationsalterabhängige Entwicklung des Proteoms**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde. Die Arbeit wurde in Teilen bereits veröffentlicht.

Essen, 07.02.2023

---

Robin Tamara Eisenburger

**11 Curriculum Vitae**

## 12 Publikationsliste

Pangratz-Fuehrer S, Genzel-Boroviczény O, Bodensohn WE, Eisenburger R, Scharpenack J, Geyer PE, et al. Cohort profile: the MUNICH Preterm and Term Clinical study (MUNICH-PreTCI), a neonatal birth cohort with focus on prenatal and postnatal determinants of infant and childhood morbidity. *BMJ Open*. 2021;11(6):e050652.