

Aus dem Institut für Medizinische Psychologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

## DISSERTATION

**Der Einfluss der Betamethasontherapie zur Lungenreifung auf das  
Methylierungsprofil der glukokortikoid-responsiven Gene NR3C1,  
11 $\beta$ HSD2, FKBP5 und die Telomerlänge in humanem  
Plazentagewebe**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sarah Kraemer

aus Bad Belzig

Datum der Promotion: 04.03.2022

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>4</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>6</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>8</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1. Intrauterine Programmierung</b> .....	<b>9</b>
<b>1.2. Der Einfluss der Glukokortikoide auf die pränatale Programmierung</b> .....	<b>10</b>
1.2.1. Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse.....	10
1.2.2. Die Glukokortikoidwirkung auf molekularer Ebene.....	12
1.2.3. Glukokortikoide und ihr Einfluss auf das fetale Wachstum.....	14
1.2.4. Die Rolle der Plazenta.....	15
<b>1.3. Pränatale Glukokortikoidexposition und Geburtsgewicht</b> .....	<b>16</b>
<b>1.4. Pränatale Glukokortikoidexposition und ihr Einfluss auf gesundheitliche Langzeitfolgen der Nachkommen</b> .....	<b>17</b>
1.4.1. Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System.....	17
1.4.2. Auswirkungen auf den Metabolismus.....	18
1.4.3. Auswirkungen auf Kognition.....	19
1.4.4. Auswirkungen auf das neuropsychiatrische System.....	20
<b>1.5. Antenatale Glukokortikoidgabe zur Lungenreifeung</b> .....	<b>21</b>
1.5.1. Indikationen der Lungenreifeinduktion.....	21
1.5.2. Durchführung.....	21
1.5.3. Vorteile der Lungenreifeinduktion.....	22
1.5.4. Langzeitfolgen der Lungenreifeinduktion.....	22
<b>1.6. Epigenetik und Zellalterungsprozesse</b> .....	<b>22</b>
1.6.1. Definition der Epigenetik.....	23
1.6.2. Der Einfluss von Glukokortikoiden auf DNA Methylierungen.....	23
1.6.3. Telomerbiologie.....	25
1.6.3.1. Struktur und Funktion der Telomere.....	25
1.6.3.2. Regulation der Telomerlänge.....	25
1.6.3.3. Einfluss der GC Exposition auf die Telomerbiologie.....	27
1.6.3.4. Epigenetische Modulation der Telomerbiologie.....	28
1.6.3.5. Geschlechtsspezifische Besonderheiten der Telomerbiologie.....	28
1.6.3.6. Die Bedeutung der Telomerbiologie für die Entstehung von Krankheit und Gesundheit.....	29
<b>1.7. Fragestellung und Arbeitshypothesen</b> .....	<b>30</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>32</b>
<b>2.1. Studienkollektiv und Probengewinnung</b> .....	<b>32</b>
2.1.1. Maternales Studienkollektiv.....	32
2.1.2. Probengewinnung.....	33
2.1.3. Kindliche Parameter.....	34
<b>2.2. Protokoll der DNA Isolierung aus humaner Plazenta</b> .....	<b>34</b>

<b>2.3. Analyse der DNA Methylierungen</b> .....	36
<b>2.4. Bestimmung der Telomerlänge</b> .....	37
<b>2.5. Statistische Auswertung</b> .....	37
2.5.1. Statistische Analyse der DNA Methylierung.....	38
2.5.2. Statistische Analyse der Telomerlänge.....	39
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>41</b>
<b>3.1. Beschreibung der Studienpopulation</b> .....	41
3.1.1. Maternale Parameter.....	41
3.1.2. Kindliche Parameter.....	43
<b>3.2. DNA Methylierungen</b> .....	47
3.2.1. Einflussfaktor: BET.....	47
3.2.2. Einflussfaktor: kindliches Geschlecht.....	49
3.2.3. Einflussfaktor: BET unter Berücksichtigung des kindlichen Geschlechts.....	50
3.2.4. Einflussfaktor: Zeitpunkt der ANS.....	50
<b>3.3. Analysen der Telomerlänge</b> .....	51
3.3.1. Einflussfaktor: BET.....	51
3.3.2. Einflussfaktor: kindliches Geschlecht.....	51
3.3.3. Einflussfaktor: BET unter Berücksichtigung des kindlichen Geschlechts.....	51
3.3.5. Einflussfaktor: Zeitpunkt der ANS.....	53
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>54</b>
<b>4.1. Einfluss der BET Exposition auf die DNA Methylierung der Kandidatengene</b> .....	55
4.1.1. NR3C1 Gen.....	55
4.1.2. 11 $\beta$ HSD2.....	56
4.1.3. FKBP5.....	57
4.1.4. Einflussfaktor: Zeitpunkt ANS.....	59
<b>4.2. Auswirkung der ANS auf die Telomerlänge</b> .....	59
<b>4.3. Auswirkung der Lungenreife auf die fetalen anthropometrischen Parameter</b> .....	61
<b>4.4. Stärken und Limitationen der Studie</b> .....	62
<b>5. Schlussfolgerung</b> .....	<b>65</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>67</b>
<b>7. Anhang</b> .....	<b>79</b>
<b>7.1. Übersicht der Regressionsanalysen für DNA Methylierungen</b> .....	79
<b>7.2. Eidesstattliche Versicherung</b> .....	82
<b>7.3. Lebenslauf</b> .....	84
<b>7.4. Danksagung</b> .....	85

## Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AG	Arbeitsgruppe
ANS	antenatale Steroidtherapie
BET	Betamethason
BMI	Body-Mass-Index
bzw.	beziehungsweise
cm	Zentimeter
CpG	5'-C-Phosphat-G-3', DNA Abschnitt mit einer Häufung der Nukleotidfolge von Cytosin-Guanin
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
DGGG	Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT1	DNA Methyltransferase 1
FDR	<i>false-discovery-rate</i>
g	Gramm
GC	Glukokortikoide
GR	Glukokortikoidrezeptor
GRE	<i>glucocorticoid response elements</i>
HHNA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
HSP	Hitzeschockprotein
min	Minute
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA (Ribonukleinsäure)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RDS	<i>Respiratory distress syndrome</i> , Atemnotsyndrom
SSW	Schwangerschaftswoche
SG	Schätzwert
TERC	<i>telomerase RNA component</i>
TERT	<i>telomerase reverse transcriptase</i>
TL	<i>Telomerlänge</i>
TRF	<i>telomeric repeat-binding factor</i>
vs.	versus
11 $\beta$ HSD2	11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Die HHNA während der Schwangerschaft.....	11
Abbildung 2: Schematische Darstellung der GC Wirkung & FKBP5 Regulation auf molekularer Ebene .....	14
Abbildung 3: DNA Replikation mithilfe der Telomerase. ....	27
Abbildung 4: Prozentualer Anteil der Geschlechter in der BET- & Kontrollgruppe.....	43
Abbildung 5: Prozentualer Anteil der Früh-/ Reifgeborenen in der BET- & Kontrollgruppe .....	44
Abbildung 6: Kopfumfang im Gesamtkollektiv für die BET- & Kontrollgruppe .....	45
Abbildung 7: Kopfumfang der reifgeborenen Kinder der BET- & Kontrollgruppe .....	45
Abbildung 8: DNA Methylierung der CpG Site cg223635209 des FKBP5-Gens in der BET- & Kontrollgruppe .....	48
Abbildung 9: DNA Methylierung der CpG Site cg223635209 des FKBP5-Gens a) aller Jungen und b) aller Mädchen .....	48
Abbildung 10: Methylierung der CpG Site cg24270678 des 11 $\beta$ HSD2 Gens bei Jungen & Mädchen.....	49
Abbildung 11: Methylierung der CpG Site cg13678281 des 11 $\beta$ HSD2 Gens bei Jungen & Mädchen.....	50
Abbildung 12: Telomerlänge in der BET- & Kontrollgruppe stratifiziert nach dem kindlichen Geschlecht.....	52

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Ein- & Ausschlusskriterien für die Betamethason (BET) Gruppe .....	33
Tabelle 2: Übersicht verwendeter Materialien und Geräte.....	36
Tabelle 3: Übersicht der maternalen Parameter .....	42
Tabelle 4: Übersicht der kindlichen Parameter .....	46
Tabelle 5: Multivariate Analyse mit dem Interaktionsterm fetales Geschlecht x ANS.....	53
Tabelle 6: Daten der Regressionsanalysen für das NR3C1 Gen .....	79
Tabelle 7: Daten der Regressionsanalysen für das NR3C1 Gen (Fortführung Tabelle 6).....	80
Tabelle 8: Daten der Regressionsanalysen für das 11 $\beta$ HSD2 Gen .....	80
Tabelle 9: Daten der Regressionsanalysen für das FKBP5 Gen.....	81

## **Zusammenfassung**

Für den Geburtshelfer stellt die antenatale Lungenreifeinduktion mit Betamethason (BET), einem exogen applizierten Glukokortikoid (GC), bei drohender Frühgeburtlichkeit die wichtigste Therapieoption zur Reduzierung der perinatalen Morbidität und Mortalität dar. Gleichzeitig konnte in zahlreichen Studien ein Zusammenhang zwischen einer übermäßigen fetalen GC Exposition und langfristigen Effekten auf das ungeborene Kind und dessen Gesundheit im weiteren Lebensverlauf aufgezeigt werden. Die molekularbiologischen Zusammenhänge für diese frühe Prägung sind nicht abschließend geklärt. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Plazenta eine zentrale Rolle bei der materno-fetalen Transmission dieser Effekte einnimmt. Als mögliche Erklärungsansätze werden sowohl epigenetische Veränderungen glukokortikoid-responsiver Gene und somit zentraler Proteinstrukturen im Plazentagewebe, als auch Modifikationen der Telomerlänge (TL), einem Marker für Zellalterung, diskutiert. Die vorliegende Arbeit untersucht daher den Einfluss der fetalen GC Exposition am klinischen Beispiel der antenatalen Steroidtherapie (ANS) auf die Methylierungsstruktur der glukokortikoid-responsiven Gene NR3C1, 11 $\beta$ HSD2 und FKBP5 sowie der TL unter Berücksichtigung von Moderationseffekten durch das kindliche Geschlecht in humanem Plazentagewebe. Insgesamt wurden 139 Plazentaprobe von Neugeborenen untersucht, wobei 54 Kinder die ANS (BET Gruppe) erhalten haben. Dem gegenüber steht eine gestationsalterkontrollierte Vergleichsgruppe ohne BET Exposition (Kontrollgruppe, n = 85). Postpartal erfolgte die DNA Isolierung aus plazentaren Gewebeprobe. Diese wurden bezüglich des Methylierungsstatus und der TL analysiert.

Für die Gene NR3C1 und 11 $\beta$ HSD2 ließen sich keine Veränderungen im Methylierungsstatus nach ANS nachweisen. Im FKBP5 Gen konnte unabhängig vom Geschlecht nach BET Exposition eine Hypomethylierung im Lokus cg22363520 beschrieben werden. Für die TL waren keine Veränderungen nach ANS nachweisbar. Diese Arbeit ist die erste Studie, welche am klinischen Beispiel der ANS Veränderungen im Methylierungsprofil glukokortikoid-responsiver Gene in der Plazenta aufzeigt. Die Effekte sollten in weiteren prospektiven Studien repliziert und vertiefend analysiert werden. Hierbei darf nicht außer Acht gelassen werden, dass bereits geringfügige Veränderungen in der Methylierungsstruktur einzelner stress-responsiver Gene bei entsprechender Umweltexposition die Vulnerabilität für stressassoziierte Erkrankungen

erhöhen können. Die Befunde dieser Arbeit bestärken daher die Wichtigkeit der aktuellen klinischen Empfehlungen, von einer repetitiven Gabe der ANS abzusehen.

## **Abstract**

For Obstetricians, antenatal steroid therapy (ANS) with betamethasone (BET), an exogenous glucocorticoid (GC), is the most important treatment option before anticipated preterm birth to induce lung maturation and reduce fetal morbidity and mortality. Many studies show that an excessive fetal GC exposition may have negative long-lasting effects on the unborn child and its health over the life course. However, the underlying biomolecular mechanisms for this early programming effect have not yet been sufficiently investigated. The placenta plays a crucial role in transmitting these effects from mother to her unborn child. The role of epigenetic modifications of GC-responsive genes and thereby modulation of key proteins in placenta tissue, as well as alterations of telomere length (TL), a marker of cellular aging, have been discussed in this context. The aim of the present study was to analyze the association between exogenous GC exposure – antenatal steroid therapy for lung maturation – and methylation pattern of the GC-responsive genes NR3C1, 11 $\beta$ HSD2 and FKBP5 as well as telomere length in the placenta. The potential moderating role of child sex was considered. A total of 139 placental samples were included, among them those of 54 children that were exposed to prenatal BET treatment in order to induct fetal lung maturation, and 85 gestational-age matched newborns without prenatal BET administration that compromised the control group. DNA was isolated from each placental sample postpartum, and methylation patterns and telomere length were analyzed following standard protocols. Our results show that BET treatment does not modify methylation patterns of the NR3C1 and 11 $\beta$ HSD2 genes. However, BET exposure was significantly associated with hypomethylation at locus cg22363520 in the FKBP5 gene, and this effect was not moderated by child sex. There was no effect of BET treatment on TL.

To our knowledge, this study is the first to examine ANS effects on the methylation patterns of glucocorticoid-responsive genes in human placental samples. Further studies are needed to replicate our initial findings. In the face of certain environmental exposures, subtle alterations in the methylation structure of single GC-responsive genes could potentially lead to a higher vulnerability for stress-related disorders later in life. Therefore, our study highlights the importance of the current clinical guidelines to avoid repetitive courses of antenatal steroid treatment.



# **1. Einleitung**

## **1.1. Intrauterine Programmierung**

Mit Beginn der Schwangerschaft wirken multiple hormonelle und zelluläre Signalkaskaden im Körper der Frau, die eine zeitgerechte Entwicklung des Kindes in den folgenden 40 Schwangerschaftswochen ermöglichen. Eine optimale Abstimmung dieser hochorganisierten Entwicklungsprozesse ist die Voraussetzung für die Gesundheit der Mutter und die optimale Entwicklung des Kindes im Mutterleib. Parallel dazu nehmen externe Faktoren Einfluss auf die fetale Entwicklung. Entsprechend dem Konzept der perinatalen Programmierung können bestimmte Umweltfaktoren während sensibler Entwicklungszeitfenster den Umbau zellulärer Strukturen und Organsysteme bewirken. Grundlage dieses Konzeptes ist das Modell der Plastizität. Da die Plastizität der kindlichen Gewebe- und Zellsysteme insbesondere während der Entwicklung in utero und früher Kindheit sehr hoch ist, wird angenommen, dass sowohl positive, als auch aversive Bedingungen (z.B. Stress- oder Gewalterfahrungen) während dieser Entwicklungsphasen besonders ausgeprägte und langandauernde Effekte auf die Gesundheit des Kindes haben können (1, 2).

Den Begriff der *intrauterinen Prägung* hat erstmals der Endokrinologe und Wissenschaftler Günter Dörner in den 1970er Jahren im Rahmen seines Forschungsansatzes der *funktionellen Teratologie* benutzt. Er schlussfolgerte, dass endogene Substanzen wie Zytokine, Hormone oder Neurotransmitter während der intrauterinen Entwicklung Einfluss auf die Programmierung von Krankheiten im weiteren Lebensverlauf nehmen können und somit teratogen wirken (3, 4). Im Jahr 1992 etablierten die Forscher David Barker und Charles N. Hales die *developmental origins of adult disease Hypothese*. Sie beobachteten, dass ein niedriges Geburtsgewicht mit einem vermehrten Auftreten von kardiovaskulären sowie metabolischen Erkrankungen in späteren Lebensabschnitten korrelierte (5-7). Um die Jahrtausendwende postulierten Peter Gluckman und Mark Hanson die *Match-Mismatch-Hypothese*, nach welcher Umweltfaktoren in sogenannten kritischen Zeitfenstern während der pränatalen Phase Einfluss auf die Genexpression und somit auf den Phänotyp des Neugeborenen nehmen. Dadurch kann schon frühzeitig die Grundlage für ein erhöhtes Krankheitsrisiko zu einem späteren Zeitpunkt im Leben gelegt werden (1). Viele der Faktoren, die im Rahmen der intrauterinen Programmierung als einflussnehmend identifiziert worden sind, wie z.B.

Stress oder Mangelernährung, aktivieren die Hypothalamus–Hypophysen–Nebennierenrinden-Achse (HHNA). Infolgedessen kommt es zu einer gesteigerten Kortisolsekretion durch die Nebennierenrinde und der endogene Glukokortikoidspiegel steigt.

## **1.2. Der Einfluss der Glukokortikoide auf die pränatale Programmierung**

Glukokortikoide (GC) gehören zur Klasse der Steroidhormone, die auf fast alle Zellen und Organsysteme im menschlichen Körper Einfluss nehmen können. Sie aktivieren katabole Stoffwechselfvorgänge und weisen eine antiinflammatorische sowie immunsuppressive Wirkung auf.

### **1.2.1. Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse**

Die Wahrnehmung und Bewertung von Stresssignalen findet im sensorischen Thalamus statt. Es folgt die Innervation des limbischen Systems sowie die Aktivierung von Neuronen im Nucleus paraventricularis, einem Kerngebiet im Hypothalamus. Diese setzen das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) frei. CRH stimuliert die Produktion und Sekretion des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH) aus der Adenohypophyse. ACTH bindet an die Melanocortin-2-Rezeptoren, die in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde lokalisiert sind, und induziert die Synthese sowie Sekretion von Kortisol. Die endogenen GC haben über die Bindung an GC Rezeptoren (GR) vielfältige Effekte zur Regulation und Koordination der Stressantwort des Organismus (8). Über eine negative Feedbackschleife führen steigende Kortisolspiegel zur Wiederherstellung der GC Hämostase. Nach Passage der Blut-Hirn-Schranke bindet Kortisol an zentrale GR. Diese sind ubiquitär in fast allen Zellen exprimiert, kommen aber in besonders hoher Dichte im Bereich des Hippocampus, im paraventriculären Nucleus des Hypothalamus sowie der Hypophyse vor (9). Wenn ausreichend Rezeptor-Liganden-Bindungen (GC-GR) eingegangen wurden, wird ein negatives Feedback induziert. Die CRH und ACTH Sekretion wird reduziert und der Ausgangszustand bzw. die GC Hämostase wird wieder hergestellt (8).

Wie in Abbildung 1 dargestellt, kommt es im Rahmen einer Schwangerschaft zusätzlich zu einer CRH Produktion durch die Plazenta. Dieser Mechanismus nimmt wesentlich Einfluss auf die Regulation der maternalen und fetalen HHNA während der

Schwangerschaft. Während die CRH Sekretion des Hypothalamus durch ansteigende maternale Kortisolspiegel gehemmt wird, stimuliert das in der Plazenta produzierte CRH, entsprechend einem positiven Feedback, die mütterliche Hypophyse (10). Infolgedessen kommt es zu einem Anstieg der ACTH Sekretion sowie in der Konsequenz zu ansteigenden Kortisolspiegeln. Die erhöhten Kortisolspiegel bilden wiederum einen Stimulus für die CRH Sekretion durch die Plazenta. Durch diesen Regelkreis erreicht das im maternalen Blut zirkulierende Kortisol im dritten Trimenon Werte, die etwa dreimal so hoch sind, wie bei Nicht-Schwangeren Frauen (10). Diese physiologische Erhöhung im letzten Drittel der Schwangerschaft ist obligat für die Reifung und Differenzierung der Organsysteme in Vorbereitung auf das extrauterine Leben (11).

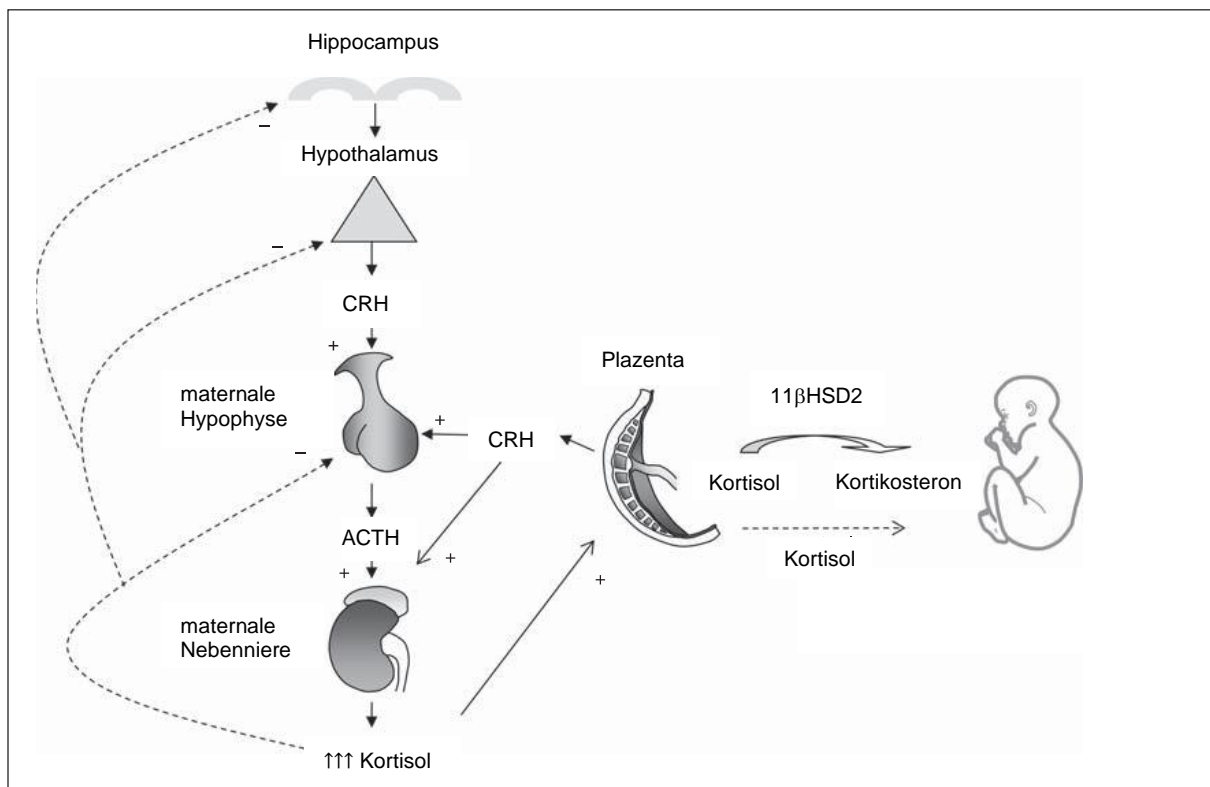


Abbildung 1: Die HHNA während der Schwangerschaft.

Im nicht schwangeren Zustand unterliegt die Kortisolsekretion durch die Nebennierenrinde einer zentral gesteuerten negativen Feedbackschleife. Während einer Schwangerschaft erfolgt eine zusätzliche CRH Produktion durch die Plazenta. Dieses plazentar gebildete CRH stimuliert die maternale Hypophyse sowie Nebennierenrinde, was zu einer verstärkten Kortisolproduktion führt. Entsprechend einer positiven Feedbackschleife stimulieren die steigenden Kortisolspiegel die Plazenta zur weiteren CRH Produktion. Die Kortisolpassage durch die Plazenta wird größtenteils durch das plazentare Enzym  $11\beta\text{HSD2}$  inhibiert. (Abb. modifiziert nach (10))

### 1.2.2. Die Glukokortikoidwirkung auf molekularer Ebene

Im Rahmen der maternalen HHNA Aktivierung kommt es zur Kortisolsekretion und wie bereits im Absatz 1.2.1. erläutert zur GC Bindung am GR. Dieser wird durch das NR3C1 Gen, welches auf Chromosomen 5 (5q31.3) lokalisiert ist, kodiert (12). Der GR ist ein Protein, welches ubiquitär exprimiert wird. Er gehört zur Familie der nuklearen Rezeptoren, die als Transkriptionsfaktoren wirken (13). Sowohl in tierischen (z.B. Maus (14), Meerschweinchen (15), Schaf (16)), als auch humanen (17) Plazenten sind verschiedene Isoformen des GR nachweisbar. Die jeweilige GR Expressionsrate ist u.a. von der GC Exposition, dem fetalen Geschlecht und dem Gestationsalter abhängig (16, 17). *Saif et al.* identifizierten 12 verschiedene Isoformen des GR in Trophoblastgewebe in humaner Plazenta. Am klinischen Beispiel der inhalativen GC Therapie bei maternalem Asthma zeigte die Arbeitsgruppe, dass Plazenten weiblicher Neugeborener eine höhere Sensitivität gegenüber den exogen applizierten GC aufweisen, als die ihrer männlichen Altersgenossen. Zudem konnte eine unterschiedliche Isoformenformation des GR nachgewiesen werden (17).

Im inaktiven Zustand ist der GR im Cytoplasma liegend an die Hitzeschockproteine (HSP) Hsp 90 und Hsp 70, dem p23 Protein sowie deren Co-Chaperonen FKBP51 oder FKBP52 gebunden. Sie bilden in ihrer Gesamtheit den GR Komplex (18). Nach Kortisolbindung am GR kommt es zur Dissoziation der Begleitproteine. Zwei aktivierte GR fügen sich zu einem sogenannten Homodimer zusammen. Es folgt die Translokation in den Nukleus (13). Die Bindung des Homodimers an der Promotorregion glukokortikoid-responsiver Gene, den sogenannten *glucocorticoid response elements (GRE)*, kann die Transkription der entsprechenden Gene aktivieren oder blockieren. Darüber hinaus kann der aktivierte GR auch als Monomer in Verbindung mit anderen Transkriptionsfaktoren glukokortikoid-responsive Genabschnitte modulieren (13, 19). Demzufolge stellt der GR einen ligandenabhängigen Transkriptionsfaktor dar und kann als solcher Einfluss auf die posttranslationalen Signalwege nehmen.

Die Proteinprodukte der GRE modulieren multiple negative Feedbackschleifen zur Wiederherstellung der GC Hämostase und Reduzierung der HHNA-Aktivität (20). Unter Beachtung der hohen Zell- und Gewebespezifität der GR induzierten Transkriptionsregulation bewirkt beispielsweise der GR im humanen Gehirn die schnelle Inhibition von Genen, die für CRH und ACTH kodieren (21-23).

Eine zentrale Rolle in der GR Regulation nimmt das *FK506-binding protein 51*, kurz FKBP5 / FKBP51, ein. Das Protein wird durch das FKBP5 Gen kodiert, welches in humanem Gewebe auf Chromosomen 6 lokalisiert ist (Chromosomen 6p21.31) (20). Dieses fungiert als ein Co-Chaperon – ein Protein, welches Einfluss auf die Faltstruktur sowie die Aktivität anderer Eiweißstrukturen nehmen kann (19). Im GR Komplex kann FKBP5 über die Bindung am HSP 90 die Sensitivität des GR modulieren.

*Wohnik et al.* zeigten im in-vitro-Experiment, dass die Bindung von FKBP5 am GR Komplex eine verzögerte Translokation in den Nukleus und somit eine Reduktion der steroidrezeptorabhängigen Transkription bewirkt (19, 24). Kommt es allerdings zur Kortisolbindung am GR, wird ein Austausch von FKBP5 gegen FK506 binding protein 52 (FKBP52/ FKBP4) induziert (siehe Abbildung 2). FKBP4 ist ebenfalls ein Co-Chaperon und fördert die Translokation des Homodimers in den Nukleus (19). Ein weiterer FKBP5 Regulationseffekt wird durch die ultrakurze Regulationsschleife erzielt. Die Aktivierung des GR induziert parallel eine gesteigerte FKBP5 Transkription und -lation (19). Durch eine gesteigerte FKBP5 Expression wird die Kortisolaffinität des GR Komplexes reduziert. Folglich werden weniger Rezeptor-Liganden-Bindungen (GC-GR) eingegangen und die Stimulation der glukokortikoid-responsiven Genabschnitte nimmt ab. Die Kortisol getriggerte Reaktion des Körpers wird abgeschwächt.

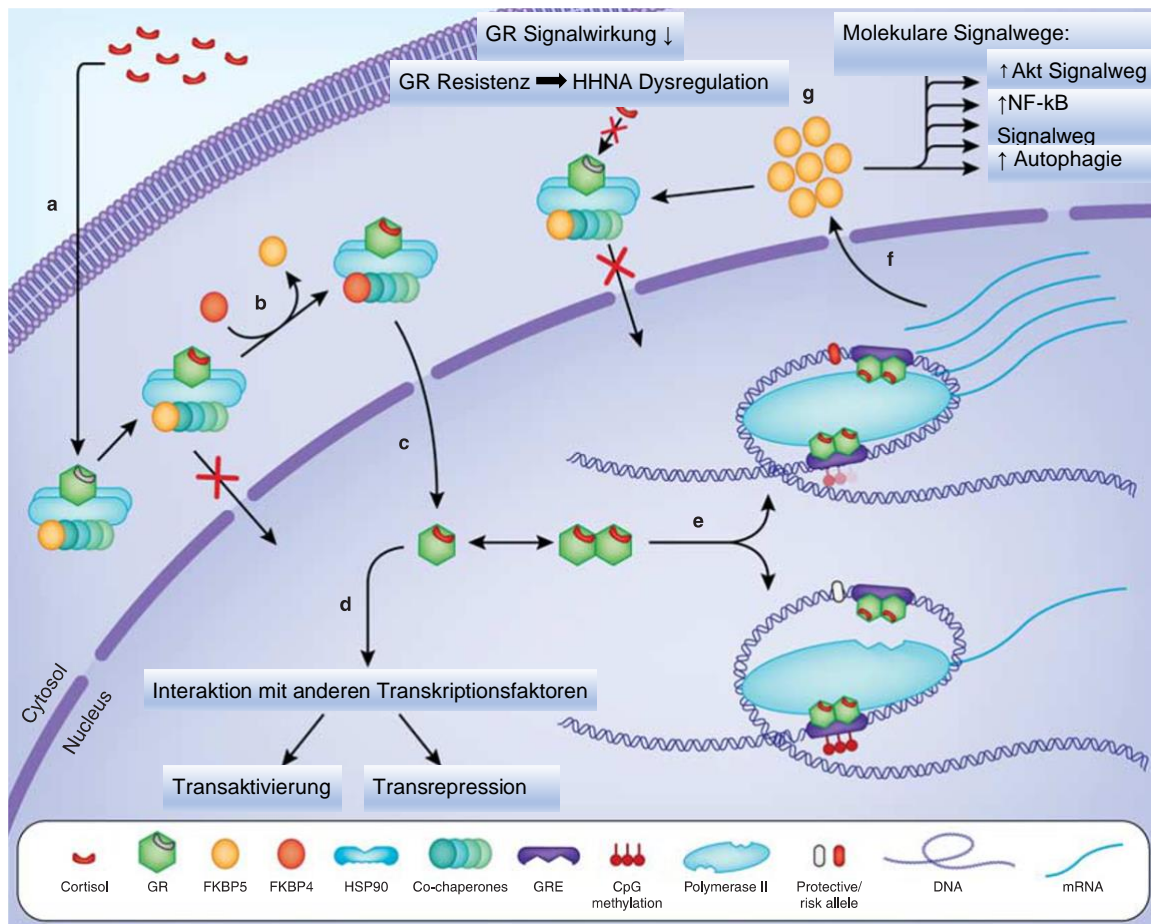


Abbildung 2: Schematische Darstellung der GC Wirkung & FKBP5 Regulation auf molekularer Ebene

Die GC Aktivierung (a) beginnt mit der Bindung des Kortisols am GR im Cytosol. Die FKBP5 Bindung am GR Komplex reduziert die Kortisollaffinität des Rezeptors. Durch die Abspaltung von FKBP5 (b), kann FKBP4 am GR Komplex binden und die Translokation des aktivierten GR (c) in den Nucleus ermöglichen. Der aktivierte GR kann (d) als Monomer in Interaktion mit weiteren Transkriptionsfaktoren Einfluss auf die Proteinbiosynthese steroidabhängiger Genabschnitte nehmen oder (e) als Homodimer in Promotorbereichen glukokortikoid-responsiver Genabschnitte binden. Durch den aktivierten GR kann sowohl die Aktivierung, als auch Repression weiterer Transkriptionsprozesse induziert werden. Unter anderem bedingt die GR Aktivierung die FKBP5 Synthese (f). FKBP5 kann wiederum (g) die Signalwirkung des GR reduzieren und somit Einfluss auf die HHNA nehmen, aber auch andere molekulare Signalwege modulieren. (Abb modifiziert nach (19))

### 1.2.3. Glukokortikoide und ihr Einfluss auf das fetale Wachstum

Das fetale Wachstum, die Gewebedifferenzierung sowie die Organreifung sind im hohen Maße von GC abhängig. Belegend dafür ist die frühzeitige Expression von GR ab der 8.-10. Gestationswoche in fast allen fetalen Geweben sowie der Plazenta (25, 26). Anhand der Beobachtungen von *Cole et al.* konnte die Lebensnotwendigkeit der GC nachgewiesen werden. In ihrem Versuch demonstrierten sie, dass Mäuse ohne GR rasch

nach der Geburt an Lungenversagen verstarben. Neben der unvollständigen Lungenreifung konnten sie auch Defizite der Leber in der Bildung zentraler Schlüsselenzyme für die Glukoneogenese aufzeigen (27). Obwohl mehrfach die Notwendigkeit der GC für die Entwicklung eines Kindes nachgewiesen werden konnte, darf nicht außer Acht gelassen werden, dass zu hohe endogene Kortisolspiegel zu Fehlanpassungen in der fetalen Entwicklung führen können. Die intrauterine Wachstumsretardierung ist u.a. mit hohen mütterlichen und kindlichen Glukokortikoidspiegeln assoziiert (28). Die fetalen Stresshormone können zudem in Reaktion auf eine mütterliche Mangelernährung, Plazentainsuffizienz oder einer unzureichenden Sauerstoffversorgung bei reduziertem plazentalen Blutfluss ansteigen (29). Es gibt immer mehr Befunde, die darauf hindeuten, dass eine langfristig erhöhte, endogene GC Exposition während der Schwangerschaft nachhaltige Folgen im Sinne einer erhöhten Krankheitsvulnerabilität im späteren Leben haben kann (10).

#### 1.2.4. Die Rolle der Plazenta

Die Plazenta nimmt eine zentrale Rolle in der Kommunikation zwischen Mutter und Fetus ein, da sie das Bindeglied zwischen dem maternalen und kindlichen Kreislauf darstellt. Hierbei ist ihre Schrankenfunktion von besonderer Bedeutung. Aufgrund ihrer Lipophilie können GC ohne Weiteres die Plazenta passieren. Dennoch weisen die fetalen physiologischen Glukokortikoidspiegel deutlich niedrigere Werte im Vergleich zu denen der Mutter auf (30). Dieser Gradient entsteht durch die Aktivität der 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 (11 $\beta$ HSD2), die in der Plazenta lokalisiert ist. Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung des aktiven Kortisols in seine inaktiven 11-Keto Formen (Kortison, 11-Dehydrokortikosteron) (31). Die 11 $\beta$ HSD2 bewirkt keine vollständige GC Blockade, reduziert die mütterlichen Glukokortikoidspiegel jedoch beträchtlich auf eine für den Fetus nicht schädigende Menge. Durch diesen Mechanismus gelangen schätzungsweise nur ca. 10-20% des maternalen Kortisols in den fetalen Blutkreislauf (32).

Im Rahmen eines akuten, mütterlichen Stressereignisses konnte eine erhöhte Aktivität der 11 $\beta$ HSD2 beobachtet werden, wodurch ein verbesserter Schutz des Fetus gewährleistet werden kann (33). Im Tierexperiment (Ratte) zeigte sich aber auch, dass eine chronische Stressexposition der Mutter zu einer Aktivitätsabnahme der 11 $\beta$ HSD2

führt (34). Infolgedessen wird der Fetus mit erhöhten endogenen GC Spiegeln konfrontiert, was Folgen für seine Entwicklung aufweist (35).

Auch die ANS zur Lungenreifeinduktion, entsprechend einem akuten, iatrogen induzierten Stressereignis, ruft quantitative Veränderungen in der Expressionsrate der 11 $\beta$ HSD2 in humanem Plazentagewebe hervor. *Braun et al.* beschreiben in ihrer aktuellen Studie (n=178), dass die BET in verschiedenen Plazentaarealen zu einer veränderten Expressionsrate der 11 $\beta$ HSD2 führt, wobei sich geschlechtsspezifische Unterschiede zeigten. Während Plazenten von Jungen, v.a. diejenigen, die vor der abgeschlossenen 37.SSW geboren worden sind, erhöhte 11 $\beta$ HSD2 Proteinnengen aufwiesen, konnte in den peripheren Plazentaarealen reifgeborener Mädchen eine verminderte 11 $\beta$ HSD2 Expression nachgewiesen werden (36). Arbeitsgruppen um *Benediktsson et al.*, *Edwards et al.* und *Seckl et al.* stellten die Hypothese auf, dass eine verminderte 11 $\beta$ HSD2 Aktivität in der Plazenta zu einer höheren GC Exposition des Fetus führt, was wiederum ein vermindertes Größenwachstum und eine erhöhte Krankheitsanfälligkeit im späteren Leben bedingt (26, 32, 35, 37). Dieser Ansatz wird durch weitere Forschungsarbeiten gedeckt, die zeigen, dass eine erniedrigte 11 $\beta$ HSD2 Aktivität mit einem reduzierten Geburtsgewicht beim Menschen (38, 39) und bei Nagetieren (40) einhergeht. Weiter zeigte *Holmes et al.* im Mausmodell, dass die Tiere mit einer homozygoten Anlage für das blockierte 11 $\beta$ -HSD2 Gen (11 $\beta$ HSD2<sup>-/-</sup> Maus) niedrigere Geburtsgewichte und ein verstärktes Angstverhalten im Vergleich zu ihren kongenen Kontrollen aufweisen (41).

### **1.3. Pränatale Glukokortikoidexposition und Geburtsgewicht**

Das Geburtsgewicht ist ein häufig genutzter Surrogatmarker zur Beurteilung der intrauterinen Entwicklungsbedingungen, die während der Schwangerschaft im Mutterleib vorlagen (29). Im Schafmodell konnte beispielsweise eine dosisabhängige Wachstumsrestriktion nach einmaliger sowie intermittierender BET Gabe verzeichnet werden (42, 43). In Humanstudien konnte eine Abnahme des Geburtsgewichts sowie ein verminderter Kopfumfang im Rahmen der BET Applikation, die bei drohender Frühgeburt zur Lungenreife indiziert ist, beobachtet werden (44-46). In einer retrospektiven Studie zeigten *Braun et al.*, dass steigende BET Dosierungen die Diskrepanz beim Geburtsgewicht zwischen Neugeborenen, die eine Lungenreife erhalten hatten, und ihrer Kontrollgruppe signifikant verstärkten. Gleichzeitig konnte keine Verbesserung bezüglich



der neonatalen Morbidität und Mortalität beobachtet werden (47). *L. Duthie* und *R.M. Reynolds* fassen in ihrem Review *Changes in the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis in pregnancy and postpartum: influences on maternal and fetal outcomes* eine Reihe humaner Studien zusammen, die eine erhöhte HHNA Aktivität in Form erhöhter maternaler Kortisolspiegel messen und bei den entsprechenden Neugeborenen ebenfalls ein vermindertes Geburtsgewicht und fetales Wachstum verzeichnen (10). Zusammenfassend weisen die Forschungsergebnisse darauf hin, dass hohe mütterliche GC Spiegel mit einem erniedrigten Geburtsgewicht assoziiert sind. Dies kann im Sinne der perinatalen Programmierung weitreichende Konsequenzen für die Krankheitsvulnerabilität im Erwachsenenalter haben. So beschreiben eine Vielzahl epidemiologischer Studien eine Korrelation zwischen einem erniedrigten Geburtsgewicht und einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre, metabolische und neuropsychiatrische Erkrankungen im späteren Leben (6, 48-51). Die Assoziation zwischen einem niedrigen Geburtsgewicht und einer erhöhten Krankheitsvulnerabilität im Erwachsenenalter sind unabhängig von sogenannten Life-Style Risikofaktoren, wie Nikotin- und Alkoholkonsum, Übergewicht, mangelnder Bewegung und sozialem Status. Es ist davon auszugehen, dass sich diese Faktoren additiv auf den Effekt des Geburtsgewichts auswirken (29). Im Gegensatz dazu gibt es auch Forschungsarbeiten, die den Ansatz der frühen Programmierung von Gesundheit und Krankheit bezüglich des Zusammenhangs zwischen einem niedrigen Geburtsgewicht und z.B. einem erhöhten kardiovaskulären Risiko als unzureichend ansehen. Kritisch betrachtet wird die fehlende Berücksichtigung postnataler Umweltfaktoren und vererbter Genvarianten (52). Folglich wäre das Geburtsgewicht „nicht per se die Ursache für das erhöhte Krankheitsrisiko im späteren Leben“ (2). Eher stellt das Geburtsgewicht die Entwicklungsbedingungen im Mutterleib dar, „welche wiederum die Physiologie des heranwachsenden Organismus und somit das Krankheitsrisiko im späteren Leben beeinflussen“ können (2).

#### **1.4. Pränatale Glukokortikoidexposition und ihr Einfluss auf gesundheitliche Langzeitfolgen der Nachkommen**

##### 1.4.1. Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System

Tierstudien: Im Schaf- (53, 54), Primaten- (55, 56) und Rattenmodell (57, 58) konnte eine Korrelation zwischen einer exzessiven, pränatalen GC-Exposition und einem erhöhten Blutdruck gezeigt werden. Infolge der erhöhten maternalen GC-Level beobachtete man

bei Ratten eine Aktivitätsveränderung im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (58, 59) ebenso wie *Zimmermann et al.* im Schafmodell nach Dexamethasongabe eine verstärkte Expression von Angiotensin-I- und II-Rezeptoren sowie Angiotensin-Konversionsenzym verzeichnen konnten (60).

Humanstudien: *Doyle et al.* nahmen die Ergebnisse von Tierstudien, die eine Assoziation zwischen pränataler GC Exposition und erhöhten Blutdrücken zeigten, zum Anlass, eine Kohorte von Frühgeborenen (Geburtsgewicht <1501g) hinsichtlich ihrer Blutdruckwerte im Alter von 14 Jahren zu untersuchen. Es zeigte sich, dass die Jugendlichen, die BET zur Lungenreifeinduktion erhalten hatten, signifikant höhere systolische sowie diastolische Blutdrücke im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwiesen (61). Höhere systolische Blutdrücke konnten *Huh et al.* auch bei Kindern im Alter von drei Jahren messen, deren Mütter bei Entbindung erhöhte Kortisol-Kortison-Quotienten aufwiesen. Hierzu entnahmen sie Blut aus der Umbilikalvene, um die GC Spiegel als Marker der 11 $\beta$ HSD2 Enzymaktivität zu bestimmen (62). *Stinson et al.* errechneten, dass Töchter von Müttern mit den höchsten Serumkortisolwerten im dritten Trimester ein signifikant höheres kardiovaskuläres Risikoprofil aufwiesen, als die Töchter, bei deren Müttern die niedrigsten Kortisolwerte zum gleichen Zeitpunkt gemessen worden sind (63, 64).

#### 1.4.2. Auswirkungen auf den Metabolismus

Tierstudien: Im Rattenmodell konnte vielfach gezeigt werden, dass eine exzessive GC Exposition in der pränatalen Phase ein reduziertes Geburtsgewicht, Hyperglykämie und Hyperinsulinämie bei den Nachkommen verursacht (65-67). *Sloboda et al.* beobachteten im Schafmodell, dass eine maternale BET Gabe zu veränderten Glucose- und Insulinspiegeln im Nabelschnurblut führt. Im heranwachsenden Schaf konnte infolgedessen ebenfalls eine veränderte Glukosehämostase beobachtet werden (58, 68). Die Zellen der Langerhans-Inseln im Pankreas sind für die Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels von zentraler Bedeutung. Der GC Einfluss zur Reifung dieses Zellsystems ist obligat. Eine übermäßige GC Exposition schädigt hingegen die Entwicklung der  $\beta$ -Zellen bei Ratten und Primaten (55, 69).

Humanstudien: In einer randomisierten, kontrollierten Follow-Up Studie konnten *Dalziel et al.* beobachten, dass 30-jährigen Probanden, deren Mütter die ANS während der

Schwangerschaft erhalten hatten, eine höhere Insulinresistenz im oralen Glukosetoleranztest aufwiesen, als Gleichaltrige in der Kontrollgruppe ohne ANS Exposition (70). Ähnliches zeigte sich bei Nachkommen von Müttern, die während ihrer Schwangerschaft ein kritisches Lebensereignis (sogenannte *major life events*) erfahren hatten und somit einer erhöhten psychischen Stressbelastung ausgesetzt waren. Auch sie wiesen signifikant höhere Body-Mass-Indices (BMI) und Insulinresistenzen auf (71). Bei der Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 tritt zunächst eine verstärkte Insulinresistenz auf, die zu Beginn mittels einer gesteigerten Insulinsekretion ausgeglichen werden kann. Im Verlauf nimmt die Insulinresistenz zu und die Insulinsekretion erreicht ihre Kapazitätsgrenze. Durch die Apoptose der  $\beta$ -Zellen kommt es postprandial zu einer pathologisch verminderten Insulinsekretion und somit zur Manifestation eines Diabetes mellitus. Folglich kann man schlussfolgern, dass das Auftreten einer erhöhten Insulinresistenz bei diesen Nachkommen zu einer frühzeitigen Manifestation eines Diabetes mellitus Typ 2 führen kann.

Weiterhin beobachteten *Entringer et al.*, dass Kinder von Mütter mit erhöhten Kortisolspiegeln zu Beginn des dritten Trimenons, in den ersten sechs Monaten einen erhöhten Körperfettanteil aufwiesen (72). Diese Beobachtung ist von klinischer Relevanz, da die Geschwindigkeit der Gewichtszunahme, insbesondere die Zunahme des Körperfettanteils im Kleinkindalter, einen wichtigen Surrogatmarker für die Entwicklung der kindlichen Adipositas darstellt (72-74).

#### 1.4.3. Auswirkungen auf Kognition

Humanstudien: Nach exogener Kortisolapplikation konnte eine Beeinträchtigung des Arbeitsgedächtnisses bei jungen Frauen beobachtet werden, deren Mütter während der Schwangerschaft ein kritisches Lebensereignis erfahren hatten (75). *Entringer et al.* schlussfolgerten daher, dass eine pränatale Stressexposition möglicherweise Einfluss auf die Entwicklung des präfrontalen Kortex nehmen kann (75). *LeWinn et al.* untersuchten maternale Kortisolproben (Serum), die im dritten Trimenon entnommen worden waren, und wendeten den Wechsler-Intelligenztest bei den dazu gehörigen Kindern im Alter von sieben Jahren sowie deren Geschwistern an. Hierbei korrelierten erhöhte maternale Kortisolspiegel mit einer erniedrigten verbalen Intelligenz der betroffenen Kinder bzw. der Geschwisterpaare (76). In einer prospektiven Studie kamen *Laplante et al.* zu einem ähnlichen Ergebnis: Kinder im Alter von fünfeneinhalb Jahren,

deren Mütter eine erhöhte Stressbelastung während der Schwangerschaft angaben, erreichten weniger Punkte im Wechsler-Intelligenztest und wiesen eine verminderte Sprachintelligenz gegenüber ihrer Kontrollgruppe auf (77).

#### 1.4.4. Auswirkungen auf das neuropsychiatrische System

Tierstudien: *Welberg et al.* beschreiben ein beeinträchtigt Coping Verhalten in aversiven Situationen bei Ratten, deren Mütter in der Spätschwangerschaft Dexamethason verabreicht bekommen haben (78). Bei Nagetieren konnte ein verändertes Größenwachstum des Hippocampus sowie eine beeinträchtigte motorische Entwicklung infolge pränataler Stressbelastungen verzeichnet werden (79). Beim Rhesusaffen bewirkt pränataler Stress erhöhte basale Kortisolspiegel und vermindert die Neurogenese (80).

Humanstudien: In einer prospektiven Longitudinalstudie untersuchten *Buss et al.* den Einfluss maternaler Angst während der Schwangerschaft auf die kindliche Gehirnentwicklung. Mittels Magnetresonanztomografie konnte eine Reduktion der grauen Substanz im präfrontalen Kortex bei den sechs- bis neunjährigen Kindern von Müttern mit starkem Angsterleben im zweiten Trimester beobachtet werden (81). In einer anderen Longitudinalstudie konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass höhere Kortisolspiegel während der frühen Schwangerschaft zu einem vergrößerten Amygdalavolumen bei Mädchen, nicht aber bei Jungen, führte. Die weibliche Kohorte wies außerdem eine höhere Prävalenz affektiver Störungen auf (82). In einem Review stellen *Glover et al.* eine Vielzahl von Studien vor, die einen Zusammenhang zwischen maternaler Depression bzw. Stress- und Angsterleben während der Schwangerschaft und einem erhöhten Risiko für affektive Störungen, Aufmerksamkeitsdefizit- und Angststörungen sowie einem gesteigerten aggressiven Verhalten bei den Nachkommen beschreiben (83). In einer retrospektiven finnischen Studie wurden die Daten von 14 868 Kindern, die die ANS erhalten hatten, mit einer Kontrollgruppe (n = 655 229) verglichen. Diese Arbeit zeigt eine Assoziation zwischen der antenatalen GC Exposition und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung psychischer Störungen sowie Verhaltensauffälligkeiten auf (84).

## 1.5. Antenatale Glukokortikoidgabe zur Lungenreifung

Laut der S2k Leitlinie *Prävention und Therapie der Frühgeburt* der deutschen, österreichischen und schweizerischen Gesellschaft für Geburtshilfe (Stand Februar 2019) betrug die Frühgeborenenrate im Jahr 2017 in Deutschland 8,36% (85).

Frühgeborene sind Kinder, die vor der abgeschlossenen 37. Schwangerschaftswoche (SSW) auf die Welt kommen. Diese haben in Abhängigkeit vom Gestationsalter, Geschlecht, Ort der Entbindung etc. ein erhöhtes Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko aufgrund der Unreife ihrer Organe, insbesondere der Lunge (86). Noch immer sterben jährlich „weltweit 965.000 frühgeborene Kinder in der Neonatalperiode und weitere 125.000 in den ersten fünf Lebensjahren infolge einer Frühgeburt“ (85). Bahnbrechend war daher die Arbeit von *Liggins & Howie* im Jahr 1972. Sie beschrieben eine Reduktion des Atemnotsyndroms (*Respiratory distress syndrome, RDS*) und somit der Mortalität der Neugeborenen, deren Mütter bei drohender Frühgeburtlichkeit 24 Stunden vor der Geburt GC verabreicht bekommen haben (87). Daher sind die Auswirkungen einer iatrogen induzierten GC Exposition im Rahmen der ANS bei drohender Frühgeburtlichkeit von hoher klinischer Relevanz (11).

### 1.5.1. Indikationen der Lungenreifeinduktion

Die Lungenreife ist bei drohender (z.B. vorzeitiger Blasensprung, vorzeitige Wehentätigkeit) oder medizinisch indizierter Frühgeburt zur Vermeidung des Atemnotsyndroms indiziert. Die Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) empfiehlt daher die Lungenreifeinduktion zwischen dem Erreichen der Lebensfähigkeit in 23+5 SSW und 33+6 SSW. Darüber hinaus sollte keine RDS Prophylaxe erfolgen, weil die fetalen Typ-2-Pneumozyten zu diesem Zeitpunkt bereits ausreichend Surfactant produzieren (85).

### 1.5.2. Durchführung

Laut Leitlinie sollen der Schwangeren 12mg BET intramuskulär verabreicht werden. Eine einmalige Wiederholung in gleicher Dosierung ist nach 24 Stunden vorgesehen. Von weiteren Wiederholungen wird abgeraten. BET ist ein synthetisch hergestelltes GC, welches die Plazenta fast ungehindert passieren kann. Dass bedeutet, BET ist kein passendes Substrat für die 11 $\beta$ HSD2 (11, 88). Parallel zur BET Gabe sollte bis zum

Abschluss der Lungenreife eine Tokolyse, eine medikamentöse Wehenhemmung, erfolgen (85).

### 1.5.3. Vorteile der Lungenreifeinduktion

Nachdem *Liggins & Howie* ihre für die Perinatalmedizin bedeutende Arbeit zum Effekt der GC auf die Lungenreifung veröffentlicht hatten, zeigten Studien in den folgenden Jahren zusätzlich eine Verbesserung der Lungencompliance, eine Zunahme des maximalen Lungenvolumens sowie der Surfactantproduktion und ein verstärktes Ansprechen auf eine postnatale Surfactantgabe (11, 89). Infolge der verbesserten Interventionsmöglichkeiten bei drohender Frühgeburt, sank die Inzidenz des Atemnotsyndroms, welches mit 60% eine der Hauptursachen perinataler Mortalität ist (11, 90). Vom einmaligen BET Zyklus profitieren auch andere Organsysteme. Infolge der unterstützten Reifung kommt es auch zu einer Reduzierung der nekrotisierenden Enterokolitis, Hirnblutungen und neonataler Frühinfektionen in den ersten 48 Lebensstunden, wodurch es insgesamt weniger stationäre Aufnahmen auf eine neonatologische Intensivstation gab. In der Summe führten diese Effekte zu einer verminderten neonatalen Mortalität (90).

### 1.5.4. Langzeitfolgen der Lungenreifeinduktion

In der S2k Leitlinie *Prävention und Therapie der Frühgeburt* wird von rezidivierenden BET Gaben aufgrund negativer Effekte auf das Lungenwachstum, der zerebellären Myelinisierung und der Retina abgeraten. Weiter wurden eine Suppression der HHNA und das gehäufte Auftreten neonataler Sepsis beobachtet (85). Auch das reguläre Schema zur Lungenreifeinduktion führt zu einer Abnahme von Geburtsgewicht, Kopfumfang und Körperlänge (91).

## 1.6. Epigenetik und Zellalterungsprozesse

Eine Vielzahl von Studien beschreiben einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten GC Exposition im Sinne eines frühen Stresserlebens und langfristigen Effekten im Gesundheits- und Krankheitsoutcome. Dennoch sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen v.a. in Humanstudien aktuell nur unzureichend erforscht. Ein denkbarer Mechanismus sind Modulationen des Epigenoms, die letztendlich zu einer veränderten Genexpression führen (58). Ein weiterer Erklärungsansatz bezieht sich auf

die Korrelation zwischen einer gesteigerten Kortisolexposition und einer beschleunigten Zellalterung. Dieser Prozess wird durch eine vorzeitige Verkürzung der Telomere, die Schutzkappen der Chromosomen, vermittelt.

#### 1.6.1. Definition der Epigenetik

Epigenetische Modifikationen bewirken Veränderungen in der Genexpression, wobei die zugrunde liegende DNA Sequenz unverändert erhalten bleibt (92). Diese Modulationen können durch DNA-Methylierung, Histon-Modifizierung und nicht-kodierende Ribonukleinsäuren (ncRNA) vermittelt werden (58). Um einen Zusammenhang zwischen einer verstärkten pränatalen GC Exposition und perinataler Programmierung nachzuweisen, liegt der Forschungsschwerpunkt derzeit auf Untersuchungen von DNA Methylierungen (2). Der Begriff der *DNA Methylierung* beschreibt das Hinzufügen einer Methylgruppe an Cytosin-Guanin-Basen, auch als *Cytosin-Guanin Sites*, kurz *CpG Sites*, bezeichnet. Regionen in der DNA, an denen besonders viele CpG Sites zu finden sind, werden auch als *CpG Inseln* bezeichnet. Bei Methylierung einer Cytosin-Guanin-Basenfolge im Promotorenbereich folgt die Inaktivierung der nachfolgenden Gensequenzen (13), wodurch „der Zugang der Transkriptionsfaktoren zu den regulatorischen Elementen des Gens eingeschränkt“ wird (2). Infolge dieser Blockade kann keine Translation erfolgen, wodurch wiederum die Genexpression vermindert bis unmöglich ist. Kommt es hingegen zur Abspaltung einer Methylgruppe (Demethylierung), kann die Gensequenz abgelesen und das Genprodukt gebildet werden (2). In Abhängigkeit vom Aktivitätsgrad der DNA Methyltransferasen und den Enzymen, die aktiv an der Demethylierung beteiligt sind, unterliegt der DNA Methylierungsstatus einer dynamischen Regulation über die Lebensspanne (93). Darüber hinaus zeigen verschiedene Humanstudien, dass Stresserlebnisse, insbesondere in der frühen Entwicklung, lang anhaltende Veränderungen im Methylierungsprofil spezifischer Kandidatengene, aber auch auf genomweiter Ebene hervorrufen können (23).

#### 1.6.2. Der Einfluss von Glukokortikoiden auf DNA Methylierungen

Im Wesentlichen können GC jedes Gewebe oder Organ durch die Aktivierung des GR beeinflussen. Wie bereits beschrieben, fungiert der GR als ein Transkriptionsfaktor, indem er an GRE im Promotorenbereich steroidabhängiger Gene bindet. Aktuelle Studien zeigen, dass GC auch direkte Veränderungen in der DNA Methylierungsstruktur bewirken

können. Hierbei handelt es sich insbesondere um Demethylierungen in CpG Inseln, die in der Nähe der GRE lokalisiert sind. Diese GC induzierten Demethylierungen weisen eine hohe Dynamik auf, sodass aktive Demethylierungsprozesse vermutet werden (23, 94, 95). *Yang et al.* konnten im Mausmodell zeigen, dass GC eine Expressionsreduktion der DNA Methyltransferase 1 (DNMT1) im Maus Hippocampus hervorrufen. Das Enzym DNMT1 ist für die Aufrechterhaltung der DNA Methylierung nach Zellteilung zuständig (96). Im Sinne der pränatalen Programmierung beobachteten *Weaver et al.* im Rattenmodell den Einfluss des maternalen Pflegeverhaltens auf den Methylierungsstatus der Promotorregionen des NR3C1 Gens im Hippocampus der Nachkommen. Ratten, deren Mütter ausgeprägte Zuwendung in Form von Fellpflege und Körperkontakt signalisierten, wiesen weniger Methylierungen in den NR3C1 Promotorregionen auf, zeigten eine geringer ausgeprägte HHNA-Aktivität in Stresssituationen und erwiesen sich im weiteren Verlauf mutiger als ihre Artgenossen, deren Mütter weniger fürsorglich waren (97). In einer Humanstudie beschrieben *McGowan et al.* Ähnliches: Suizidopfer, die in der Kindheit Missbrauch und / oder schwere Vernachlässigung erfahren hatten, wiesen eine verminderte GR-Expressionsrate bzw. vermehrte Methylierungen in den Promotorsequenzen des NR3C1 Gens im Hippocampusgewebe auf (98).

Ein weiteres in diesem Zusammenhang untersuchte Gen ist das FKBP5 Gen. FKBP5 reguliert, wie bereits in Kapitel 1.2.2. beschrieben, u.a. durch eine ultrakurze negative Feedbackschleife die GR Aktivität (20, 99). Kommt es aufgrund eines veränderten Methylierungsstatus zu einer übermäßigen FKBP5 Expression induziert das Co-Chaperon eine zunehmende GR Resistenz. Die negativen Feedbackschleifen werden dereguliert, die Aktivierung der HHNA verlängert, die Kortisolexposition persistiert und der Organismus findet sich in einem Zustand einer anhaltenden Stresssituation wieder (100). Diese Situation erhöht langfristig das Risiko für die Entwicklung psychiatrischer Erkrankungen, wie beispielsweise eine posttraumatische Belastungsstörung oder eine Depression (101, 102). Darüber hinaus kann FKBP5 die DNA Methylierung anderer Genen modulieren. Im Speziellen beobachteten *Gassen et al.*, die durch FKBP5 gesteuerte Inhibierung der DNMT1 (103), wodurch globale Folgen für das DNA Methylierungsprofil entstehen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass epigenetische Modifikationen, insbesondere DNA Methylierungen, einen Erklärungsansatz für zugrunde liegende molekulare



Mechanismen der perinatalen Programmierung bieten. Epigenetische Veränderungen bergen das Potential langfristig Einfluss auf die Zellfunktion auszuüben, wodurch u.a. die Entwicklung von Erkrankungen begünstigt werden kann (23).

### 1.6.3. Telomerbiologie

Die Telomerlänge (TL) stellt einen weiteren Mechanismus für die Vermittlung von Effekten der frühen Programmierung von Gesundheit und Krankheit dar. Die Telomerbiologie kann durch epigenetische Modifikationen ebenfalls wesentlich beeinflusst werden. Beispielsweise zeigen Studien, dass eine erhöhte Kortisolexposition im Rahmen von Stresserfahrungen mit einer beschleunigten Zellerterung gemessen an der TL assoziiert ist (104).

#### 1.6.3.1. Struktur und Funktion der Telomere

Als Telomere bezeichnet man nicht-kodierende DNA-Sequenzen an den Chromosomenenden, die sich beim Menschen durch die repetitive Sequenz (TTAGGG)<sub>n</sub> und einer Länge von 2-30 Kilobasenpaare auszeichnen (105, 106). Ihre Enden sind durch einen einzelsträngigen Guanin-reichen Überhang am 3'Ende der DNA charakterisiert (107). Dieser Überhang formt eine doppelte Schleifenform, die sich aus einer doppelsträngigen T-Schleife (*telomere loop*) und einer einzelsträngigen D-Schleife (*displacement loop*) zusammensetzt (108). Innerhalb dieser Schleifen binden spezifische Proteine, wie *telomeric repeat-binding factors* (TRF) 1 und TRF2. In ihrer Gesamtheit bezeichnet man die in den Schleifen gebundenen Proteine als *Shelterin-Komplex* (109, 110). Dieser Komplex sowie die charakteristische Schleifenform tragen zur Stabilisierung und zum Schutz der freien Chromosomenenden bei. Wäre dieser Schutzmechanismus nicht gegeben, würden freie Chromosomenenden irrtümlicherweise vom DNA Reparatursystem als DNA-Bruch erkannt werden. Infolge des Reparaturmechanismus wäre ein Informationsverlust möglich (111). Somit tragen Telomere zum Erhalt der Zell- und Gewebefunktion bei (112).

#### 1.6.3.2. Regulation der Telomerlänge

Mit jeder Zellteilung verkürzen sich die Telomere, was auch als *end replication problem* bezeichnet wird. Im Rahmen der semikonservativen Replikation, kodiert die DNA Polymerase jeweils einen Elternstrang mit dem Ziel der DNA-Vervielfältigung. Da die

DNA Polymerase nur in 3'-5' Richtung kontinuierlich synthetisieren kann, erfolgt am anderen Strang eine diskontinuierliche Synthese mithilfe von RNA-Primern (113). Das *end replication problem* begründet sich darin, dass die Primer am äußersten 5'-Ende des Tochterstrangs nicht ersetzt werden können, weshalb es bei jeder Zellteilung zum Verlust von DNA kommt. So verliert jedes Telomer pro Replikationszyklus circa 30-150 Basenpaare (114, 115). Die kontinuierliche Verkürzung der Telomere führt somit zu einer Limitierung der Zellteilung. Ist eine bestimmte Kürze erreicht (sogenannte Hayflick-Grenze), tritt die Zelle in den Zellarrest, auch als Stadium der Seneszenz bezeichnet, oder geht in die Apoptose (116). Abbildung 3 zeigt am Beispiel der Telomerase einen Mechanismus auf, der Seneszenz frühzeitig zu entgehen. Diese kann Telomere nach Replikationsende wieder verlängern (115). Bei dem Enzym handelt es sich um eine Reverse Transkriptase, die sich aus zwei Untereinheiten zusammensetzt: der *telomerase RNA component* (TERC) und der *telomerase reverse transkriptase* (TERT). Während die TERC die Vorlage der DNA Synthese bildet, ist die TERT für die Katalyse der Telomerverlängerung zuständig (117). Durch die reverse Transkription der RNA-Vorlage entstehen passende Gegenstücke, die die Telomerase an den DNA Strang anfügt, wodurch das 3'-Ende der Telomere wieder verlängert werden kann (siehe Abbildung 3) (118). Infolgedessen entsteht die charakteristische Telomerasequenz (TTAGGG)<sub>n</sub>. Während die Telomerase in der Embryonalzeit noch aktiv ist, wird sie postnatal in den meisten Zellen inaktiviert (119). Ausnahmen bilden hierbei Zellen mit erhöhtem Zellteilungsbedarf wie Keimzellen, aktivierte Lymphozyten, Stammzellen sowie bestimmte Haut- und Schleimhautzellen (120, 121). Die Telomerase reguliert demzufolge die TL und trägt darüber wesentlich zum Erhalt der Zellfunktion bei (104).

Die TL selbst unterliegt multiplen Einflussgrößen. Hierzu gehören z.B. genetische Faktoren, die Ethnizität, das väterliche Alter bei Zeugung, aber auch der mütterliche Bildungsgrad. Auch das fetale Geschlecht gilt als ein moderierender Faktor der TL. So weisen Mädchen tendenziell längere Telomere auf, als ihre männlichen Altersgenossen. Die Verkürzung der Telomere kann durch Inflammationsprozesse und oxidativen Stress beschleunigt werden (122).

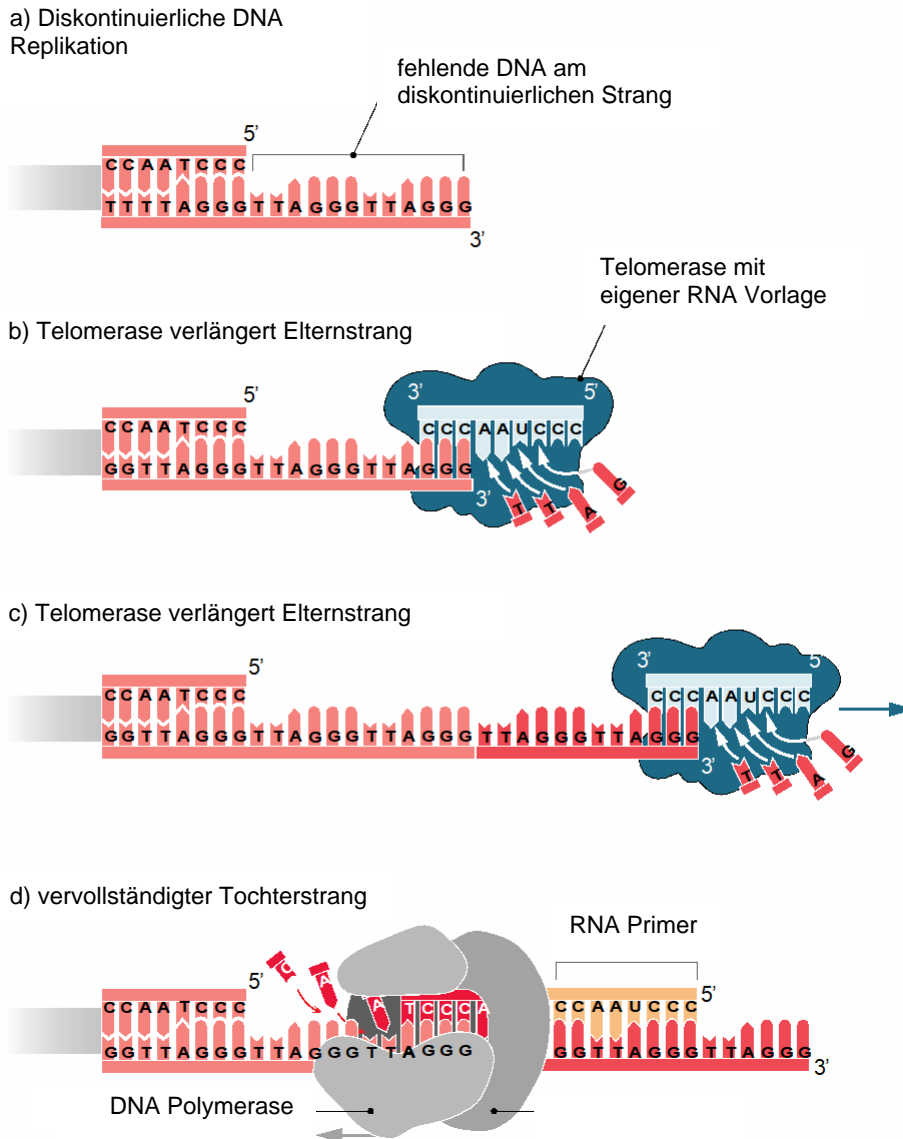


Abbildung 3: DNA Replikation mithilfe der Telomerase.

Die diskontinuierliche DNA Replikation (a) ist darin begründet, dass die DNA Polymerase nur in 3'-5' Richtung kontinuierlich synthetisieren kann. Anhand der reversen Transkription der eigenen RNA Vorlage kann die Telomerase (b) passende Gegenstücke synthetisieren und (c) das DNA 3'-Ende verlängern. Im Anschluss vervollständigt die DNA Polymerase (d) in 3'-5' Richtung kontinuierlich den DNA Tochterstrang. (Abb. modifiziert nach (123))

### 1.6.3.3. Einfluss der GC Exposition auf die Telomerbiologie

Bereits bei Neugeborenen konnte eine Telomerverkürzung proportional zum Stresserleben der Mutter während der Schwangerschaft beobachtet werden (123, 124). Andere Humanstudien zeigen, dass geburtshilfliche Komplikationen wie beispielsweise

der Gestationsdiabetes durch eine Erhöhung des oxidativen Stresses mit einer Verkürzung der leukozytären TL Neugeborener sowie einer verstärkten Expression der mitochondrialen Telomerase assoziiert sind (104). Ebenfalls spiegeln sich die Effekte von Kindesmisshandlung, Vernachlässigung oder anderen Kategorien aversiver Kindheitserfahrungen in einer signifikanten Verkürzung der TL wider. Besonders auffallend war die Konsistenz dieser Effekte, die unabhängig vom Zeitpunkt der Messung (Kindes- versus Erwachsenenalter) reproduzierbar waren (123, 125). Aktuelle Daten gehen von einer Überaktivierung der maternalen HHNA während der Schwangerschaft aus. Infolgedessen kommt es zu einer erhöhten Kortisolproduktion sowie einer verstärkten Plazentapassage der GC (112). Wegweisend ist daher die Arbeit von *Choi et al.* In der Arbeit zeigt die Arbeitsgruppe eine Reduktion der Telomeraseaktivität in humanen T-Lymphozyten bei erhöhter Kortisolexposition auf. Das Ergebnis des in-vitro-Versuchs zeigt sich sowohl bei CD4, als auch bei CD8 positiven Leukozyten konstant. *Choi et al.* beobachten zusätzlich eine reduzierte Transkriptionsrate der TERT (126). Diese Beobachtung wird von *de Punder et al.* gestützt, die eine verminderte Telomeraseaktivierung in Immunzellen bei Individuen mit einer überdurchschnittlich ausgeprägten Kortisolproduktion aufzeigten (104, 127).

#### *1.6.3.4. Epigenetische Modulation der Telomerbiologie*

Auch das Telomersystem unterliegt der Regulation epigenetischer Prozesse, vor allem durch Chromatin bzw. Histon Modifikationen. Die TL ist abhängig vom Methylierungsgrad spezifischer Histonregionen. Bei Methylierung dieser Histonbereiche kann die genetische Information der Telomerasequenzen nicht transkribiert werden (104, 128). Auch epigenetische Modulationen im Bereich der Promotorregion des TERT Gens können über eine eingeschränkt Telomeraseaktivität zu einer Verkürzung der TL führen (104). Aktuell bedarf es jedoch weitere Forschung, inwiefern diese epigenetischen Mechanismen im Rahmen einer übermäßigen pränatalen Kortisolexposition Einfluss auf die TL und somit der frühen Programmierung von Gesundheit und Krankheit nehmen (104).

#### *1.6.3.5. Geschlechtsspezifische Besonderheiten der Telomerbiologie*

Eine wachsende Anzahl von Arbeiten verweist auf potentielle geschlechtsspezifische Unterschiede in der pränatalen GC Exposition mit Auswirkungen auf die TL. In Abhängigkeit von der Ursache und dem Zeitpunkt weisen sowohl Jungen, als auch

Mädchen eine bestimmte Vulnerabilität gegenüber der Kortisolexposition auf (112, 129-131). Welches Geschlecht letztendlich besonders vulnerabel auf eine gesteigerte Kortisolexposition reagiert, ist aktuell noch nicht abschließend geklärt und die Datenlage widersprüchlich (112). Des Weiteren besteht der Verdacht auf eine geschlechts- und gestationsalterspezifische Modulation der maternalen Kortisolproduktion. *DiPetro et al.* bestimmten Kortisolwerte (Speichel) bei Schwangeren zwischen der 24.-38. SSW. Frauen, die einen Jungen erwarteten, wiesen am Ende des 2. Trimenons / Anfang des 3. Trimenons höhere Kortisolwerte auf. Ab der 30. SSW hatten hingegen Frauen, die mit einem Mädchen schwanger waren, höhere Kortisolspiegel (132). Zusammenfassend zeichnen sich zwei Zusammenhänge anhand der Forschungsergebnisse ab: zum einen korreliert das fetale Geschlecht mit einer geschlechtsspezifischen Kortisolproduktion, zum anderen birgt die Kortisolexposition in utero bereits geschlechtsspezifische Auswirkungen auf die TL (112).

#### *1.6.3.6. Die Bedeutung der Telomerbiologie für die Entstehung von Krankheit und Gesundheit*

Telomere nehmen in ihrer Funktion als Schutzkappen der Chromosomen eine grundlegende Rolle bei der Erhaltung der genomischen Integrität und somit auch der Zellfunktion ein. Eine Vielzahl von Human- und Tierstudien zeigen eine Korrelation zwischen einer Verkürzung der TL bzw. einer reduzierten Telomeraseexpression, der verfrühten Entwicklung altersbedingter Erkrankungen sowie einer reduzierten Lebensdauer auf (104). Anhand dieser Beobachtungen lässt sich schlussfolgern, dass die initiale TL Neugeborener eine besondere Bedeutung hat und einen potentiellen Biomarker für das Erkrankungsrisiko über die Lebenszeit darstellt (112). Zudem wird die TL bzw. Telomeraseaktivität nicht als statischer Zustand, sondern viel mehr als ein modellierbares System angesehen, auf welches die intrauterine Umgebung entscheidend Einfluss nehmen kann (104). Diese Effekte persistieren ein Leben lang. Beispielsweise zeigen vier groß angelegte Longitudinalstudien von *Benetos et al.*, dass die stärksten Variationen der TL der Probanden bereits im Kindesalter auftraten und diese Unterschiede in den folgenden sechs Lebensdekaden konstant blieben (104, 133). Als pränatale Einflussfaktoren gelten geburtshilfliche Komplikationen (z.B. Gestationsdiabetes, Präeklampsie), maternale Stressexposition und psychiatrische Erkrankungen (z.B. Depressionen), mütterliches Übergewicht / Adipositas, Mangelernährung etc. (104, 134). Daher stellt die Identifikation potentieller Ursachen für

die Telomerverkürzung Neugeborener einen zentralen Ansatz im Verständnis der pränatalen Prägung der materno-fetalen Einheit dar (135). Im Sinne der *developmental origins of adult disease* Hypothese könnten frühzeitig Faktoren identifiziert werden, die eine langfristige Gesundheit der Kinder fördern bzw. die mit einem erhöhtem Erkrankungsrisiko assoziiert sind. So könnten Risikopatienten frühzeitig identifiziert und eine individuelle Prävention initiiert werden.

### **1.7. Fragestellung und Arbeitshypothesen**

Aktuelle Studien zeigen vielfältige Auswirkungen der GC auf den heranwachsenden Fetus auf. Zum einen sind sie für seine zeitgerechte Entwicklung obligat, zum anderen birgt ein GC Überschuss bzw. eine zu hohe exogene BET Applikation, das Risiko einer Wachstumsrestriktion und negativer Langzeiteffekte für die Gesundheitsentwicklung. Im Forschungsfeld der pränatalen Programmierung rückt zunehmend die Frage nach den zugrundeliegenden Mechanismen in den Fokus. Ein Erklärungsansatz stellen epigenetische Veränderungen sowie Modulationen der Telomerbiologie aufgrund einer gesteigerten intrauterinen GC Exposition dar. Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss der pränatalen GC Exposition am Beispiel der ANS zur Lungenreifeinduktion auf molekularbiologische Veränderungen im humanen Plazentagewebe. Der Fokus liegt hierbei auf DNA Methylierungen der glukokortikoid-responsiven Gene NR3C1, 11 $\beta$ HSD2 und FKBP5, die eine zentrale Rolle in der materno - fetalen GC Hämostase einnehmen, und der Telomerlänge. Darüber hinaus findet der moderierende Einfluss des kindlichen Geschlechts Berücksichtigung. Viele Studien beobachteten im Rahmen einer pränatalen GC Exposition unterschiedliche Auswirkungen auf der Methylierungsebene bei Jungen und Mädchen. Des Weiteren darf nicht außer Acht gelassen werden, dass Mädchen tendenziell längere Telomere aufweisen als Jungen (122). Somit weisen die Neugeborenen bereits auf der Grundlage ihres Geschlechts Unterschiede in den Outcome-Maßen auf.

Hypothese I:

Die maternale Betamethasonbehandlung in der Schwangerschaft bei drohender Frühgeburt ist mit Veränderungen des Methylierungsprofils der plazentaren Gene NR3C1, 11 $\beta$ HSD2 und FKBP5 assoziiert. Dieser Zusammenhang wird durch das fetale Geschlecht moderiert.

Hypothese II:

Die Betamethasonexposition in der Schwangerschaft führt zu einer verkürzten Telomerlänge im humanen Plazentagewebe. Dieser Zusammenhang wird durch das fetale Geschlecht beeinflusst.

## **2. Material und Methoden**

Die Rekrutierung des Patientenkollektivs für die vorliegende prospektive Fall-Kontroll-Studie erfolgte in der Klinik für Geburtsmedizin der Charité, Campus Virchow Klinikum sowie Campus Mitte, von Mai 2008 bis März 2013. Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Sekundäranalyse. Die Sammlung des Plazentamaterials war bereits durch die Arbeitsgruppe (AG) „Perinatale Programmierung“, einer AG der Abteilung Experimentelle Geburtsmedizin der Klinik für Geburtsmedizin der Charité, erfolgt.

### **2.1. Studienkollektiv und Probengewinnung**

#### **2.1.1. Maternales Studienkollektiv**

Die Rekrutierung der Schwangeren erfolgte präpartal auf den genannten geburtsmedizinischen Stationen der Charité. Einschlusskriterien für Mütter mit drohender Frühgeburt waren das maternale Alter (18. - 45. Lebensjahr), das Vorliegen einer Einlingsschwangerschaft, der Erhalt eines einmaligen BET Zyklus mit 2x12mg Betamethason i.m. im Abstand von 24 Stunden während eines Gestationsalters zwischen 23+5 und 34+0 Schwangerschaftswochen (SSW) sowie ein fetales Schätzwert (SG) zwischen der 10. – 90. Perzentile zum Zeitpunkt der ANS (siehe Tabelle 1). Als Ausschlusskriterien wurden Geburten vor Abschluss der vollständigen Lungenreife, die Gabe mehrfacher BET Zyklen, maternale Erkrankungen (Gestationsdiabetes, Präeklampsie, Eklampsie, HELLP Syndrom, Morbus Cushing sowie Erkrankungen, die eine GC haltige Therapie bedürfen) berücksichtigt. Bei Erfüllung der genannten Kriterien konnten die Frauen nach Aufklärung und Unterzeichnung der Einwilligungserklärung in die Studie aufgenommen werden. Unter Berücksichtigung des Gestationsalters erfolgte die Rekrutierung der Kontrollgruppe. Diese setzt sich aus Frauen zusammen, die ebenfalls die genannten Kriterien mit Ausnahme der Indikation zur ANS erfüllten.

Mithilfe der Mutterpässe konnten die Daten bezüglich des Gewichts bei Schwangerschaftsfeststellung, der Gewichtszunahme, der Größe, des Alters sowie der Anzahl von Schwangerschaften und Geburten erfasst werden. Informationen zum Aufnahmegrund, schwangerschaftsassoziierter Erkrankungen / Komplikationen, antibiotischer Vorbehandlung, Ethnizität, Nikotinkonsum und Entbindungsmodus konnten der Patientenakte entnommen werden. Die Berechnung des maternalen BMIs erfolgte anhand der Formel Körpergewicht [kg] / (Körpergröße [m])<sup>2</sup>. Das fetale Schätzwert



basiert auf dem Sonografiebefund bei Aufnahme. Die Ethnizität der Teilnehmerinnen wurde in die Kategorien europäisch versus nicht-europäisch zusammengefasst.

<b>Einschlusskriterien</b>	<b>Ausschlusskriterien</b>
maternales Alter: 18. - 45. Lebensjahr	
Einlingsschwangerschaft	
ANS Gabe zwischen 23+5 und 34+0 SSW	Geburt vor Abschluss der ANS
Schätzwicht: 10. - 90. Perzentile	
einmaliger BET Zyklus $\Rightarrow$ 2x12mg i.m.	mehrfache BET Zyklen
	maternale Erkrankungen: - Gestationsdiabetes - Präeklampsie, Eklampsie, HELLP - Morbus Cushing
	GC haltige Therapien

*Tabelle 1: Ein- & Ausschlusskriterien für die Betamethason (BET) Gruppe*

### 2.1.2. Probengewinnung

Unter Verwendung einer in 16 Sektoren eingeteilten Kreisschablone erfolgte die systematische Entnahme der Plazentaprobe unmittelbar nach Abschluss der Nachgeburtsperiode (siehe auch (36)). Entsprechend der Fragestellung des primären Studiendesigns wurden sowohl Proben aus zentralen, als auch peripheren Anteilen der Plazenta gewonnen, um regionale Unterschiede in der Vaskularisation und Genexpression zu berücksichtigen (36). Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Anschluss bei einer Temperatur von  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Bei der Planung der vorliegenden Sekundäranalyse wurden die Proben unter Berücksichtigung des Geschlechts und Therapieregimes in vier verschiedene Gruppen zusammengefasst (mit und ohne BET sowie Frühgeborene versus Reifgeborene). Folglich sind in der Kontrollgruppe zu gleichen Teilen Frauen mit einer Frühgeburt, jedoch ohne ANS, vertreten. Als Pendant dazu konnte in der BET Gruppe auch Plazentamaterial von reifgeborenen Kindern untersucht werden. Demzufolge kann die Frühgeburtlichkeit in den folgenden Analysen als konfundierende Variable ausgeschlossen werden.

Für die vorliegende Arbeit erfolgte die Probenauswahl anhand der Menge des verbliebenen Plazentamaterials ( $n = 139$ ). Da teilweise nur sehr kleine bis unzureichende

Materialbestände vorlagen, wurde Plazentagewebe aus unterschiedlichen Arealen verwendet.

### 2.1.3. Kindliche Parameter

Die Erhebung der anthropometrischen Daten (Geburtsgewicht, Körperlänge, Kopfumfang) der Neugeborenen erfolgte im Rahmen der postnatalen Erstuntersuchung. Diese wurden von den Hebammen durchgeführt. Dabei fanden einheitliche Maßbänder und Waagen Anwendung. Der Ponderal-Index berechnet sich aus Körpergewicht [kg] / (Körpergröße [m])<sup>3</sup>. Dieser Index dient der Beurteilung der Konstitution des Neugeborenen (136).

Weiterhin wurde der sogenannte APGAR Score nach 1,5 und 10 Minuten postnatal erhoben. Der APGAR Score wird zur Beurteilung des klinischen Zustands des Neugeborenen verwendet. Bei einer Gesamtzahl von <5 Punkten liegt eine vitale Bedrohung für das Neugeborene vor, 5-8 Punkte entsprechen einer grenzwertigen, beobachtungsbedürftigen Situation, 9-10 Punkte erreichen lebensfrische Neugeborene. Entsprechend der routinemäßigen Versorgung Neugeborener erfolgte ebenfalls die Ermittlung des Säure-Basen-Status aus der Nabelarterie zur Diagnose und Einschätzung einer potentiell unter der Geburt entstandenen Azidose. Der Grenzwert des pH-<sub>NA</sub> liegt bei 7,00 (137).

## 2.2. Protokoll der DNA Isolierung aus humaner Plazenta

In Vorbereitung auf die folgenden Analysen musste die Extraktion der DNA aus dem Plazentagewebe erfolgen. Für die vorliegende Arbeit habe ich zum Erhalt optimaler Messergebnisse hinsichtlich des DNA Reinheitsgrades die Methode der DNA Extraktion aus humanem Plazentagewebe durch mechanische Homogenisierung und Verwendung des Quick-DNA™ Miniprep Plus Kits (Zymo Research, Irvine, USA; Katalognummer D4068) etabliert.

### I. Probenvorbereitung:

Als Probengefäße wurden die Lysing Matrix D Röhrchen mit Keramikkugeln (*ceramic beads*) der Firma MP biochemicals verwendet. Vom gefrorenen Plazentagewebe wurden jeweils ca. 25mg auf Trockeneis abgewogen und dem Lysing Matrix Röhrchen zugeführt. Die Keramikkugeln sowie die Plazentaprobe wurden zunächst mit 295µl Aqua destillata

benetzt. Im Anschluss wurden 95µl Solid Tissue Puffer (Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit, Zymo Research) zugegeben.

## II. Mechanische Homogenisierung:

Die Lysing Matrix D Röhrchen wurden in den FastPrep 24 (MP Biomedicals) eingesetzt. Der Homogenisator wurde unter Verwendung der Grundeinstellung (MP24x2) für insgesamt 90 Sekunden mit einer Geschwindigkeit von 6m/s genutzt. Danach wurden alle Proben 5 Minuten bei einer Geschwindigkeit von 5000xg zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5424R). Die Überstände wurde in Mikroreaktionsröhrchen (Eppendorf;1,5ml) überführt.

## III. Enzymatischer Verdau:

Für den enzymatischen Verdau fand die Proteinkinase K Anwendung. Jede Probe wurde mit 10µl Proteinkinase K (Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit, Zymo Research) versetzt. Es folgte die Inkubation der Proben bei einer Temperatur von 55°C für insgesamt zwei Stunden. Nach gründlichem Mischen der Proben wurden jeweils 200µl der Lösung in ein neues Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf; 2mL) überführt.

## IV. DNA Extraktion:

Der weitere Versuchsablauf entspricht dem Herstellerprotokoll des Quick-DNA™ Miniprep Plus Kits (Zymo Research, Irvine, USA) für feste Gewebeproben. Alle im Folgenden genannten Lösungen sind Bestandteile des DNA Kits. Für das Zentrifugieren wurde die Zentrifuge von Eppendorf 5804R genutzt.

Zu der bereits extrahierten Lösungen (á 200µl) wurden jeweils 400µl Genomic Binding Pufferlösung hinzugegeben. Die Lösungen wurden gründlich vermischt und in eine sogenannte Zymo Spin IIC-XL Säule transferiert und für eine Minute bei >12000xg zentrifugiert. Die spezielle Reaktionssäule der Firma Zymo wurde in ein neues Reaktionsgefäß eingesetzt, mit 400µl DNA Pre-Wash Buffer gewaschen und zentrifugiert (eine Minute bei >12000xg). Das Reaktionsgefäß wurde im Anschluss entleert und das spezielle Röhrchen wieder eingesetzt. Analog zu den vorherigen Schritten wurde die Spezialsäule nochmals mit zunächst 700µl g-DNA Wash Buffer versetzt, zentrifugiert und dann mit 200µl g-DNA Wash Buffer gewaschen. Im Anschluss an die erneute Zentrifugierung wurde das Eppendorfgefäß verworfen und die Zymo-Spin Säule in ein Neues eingesetzt. Im letzten Schritt erfolgt die Elution mit 50µl DNA Elution Puffer. Nach

einer Inkubationszeit von insgesamt 5 Minuten bei Raumtemperatur erfolgt die letzte Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für eine Minute.

#### V. Interne Qualitätskontrolle:

Zur Überprüfung des Reinheitsgrades der DNA sowie der Konzentrationsbestimmung fand der FLUOstar Omega (BMG Laptech) Anwendung. Ein hoher DNA Reinheitsgrad wurde bei dem Verhältnis  $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$  angenommen.

#### VI. Lagerung:

Alle Proben wurden aliquotiert und bei einer Temperatur von  $-80^{\circ}\text{C}$  eingelagert.

<b>Materialien, Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
Lysing Matrix D, 2mL Tube	MP Biomedicals
Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit, Katalognummer D4068	Zymo Research
Ampuwa Spüllösung	Fresenius Kabi

<b>Geräte</b>	<b>Firma</b>
FastPrep®-24	MP Biomedicals
Feinwaage	Sartorius
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5424R
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5804R
FLUOstar Omega	BMG Laptech

*Tabelle 2: Übersicht verwendeter Materialien und Geräte*

### **2.3. Analyse der DNA Methylierungen**

Die Analyse des DNA Methylierungsprofils aus humaner Plazenta erfolgte am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München, Deutschland, durch Frau M. Rex-Haffner. Es wurde jeweils  $1\mu\text{g}$  DNA der insgesamt 139 Plazentaprobe gelöst in  $40\mu\text{l}$  DNA Elution Buffer (Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit, Zymo Research, Irvine, USA) an das dortige Labor übergeben.

Laut Protokoll wurde zunächst die Bisulfit Konversion der DNA mithilfe des EZ-96 DNA Methylation Kit (Zymo Research, Irvine, USA) durchgeführt. Zur Erfassung des Genom-

weiten Methylierungsstatus fanden die Illumina Infinium MethylationEPIC Arrays (Illumina Inc., San Diego, USA) entsprechend dem Herstellerprotokoll Anwendung. Die Auswertung der Arrays erfolgte unter Verwendung des iScan Systems (Illumina Inc., San Diego, USA). Für die Analysen der vorliegenden Arbeit wurden die CpGs untersucht, die auf den EPIC Arrays abgebildet worden waren und in den 3 Kandidatengenen lokalisiert sind (NR3C1 Gen: 89 CpGs, 11 $\beta$ HSD2 Gen: 23 CpGs und FKBP5 Gen: 50 CpGs). Die Qualitätskontrolle erfolgte mithilfe der R-Software *minfi*. Das finale Datenset beinhaltete insgesamt 162 getestete CpGs der drei Kandidatengene.

#### **2.4. Bestimmung der Telomerlänge**

Die Bestimmung der Telomerlänge erfolgte am *Center for Environmental Sciences* an der Universität in Hasselt, Belgien, durch die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. T. Nawrot mittels Real-Time PCR (qPCR). Hierfür wurde pro Probe 1 $\mu$ g DNA benötigt. Zunächst erfolgte die Überprüfung der DNA Integrität mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese. Für die qPCR wurden pro Probe genau 5ng DNA benötigt. Eine genau Beschreibung der Analyseschritte der Arbeitsgruppe für die Ermittlung der TL mittels qPCR findet sich im Anhang, Kapitel 3, der Arbeit von *Martens et al.* (138).

Für die Berechnung der Telomerlänge wurde die Software *qBase* (Biogazelle, Zwijnaarde, Belgium) verwendet. Die relative Telomerlänge wird im Folgenden als T/S-Ratio angegeben. Hierbei entspricht *T* der relativen Telomerlänge, die ins Verhältnis zur Sequenzlänge eines Referenzgens, einem *single copy gene* (*S*), gesetzt wird.

#### **2.5. Statistische Auswertung**

Die statistischen Analysen bezüglich der deskriptiven Statistik und Charakterisierung der Stichprobe wurden mit der Software SPSS 25 (IBM SPSS Statistics, Armonk, New York, USA) durchgeführt. Ergebnisse mit  $p < .05$  wurden als signifikant gewertet.

Im ersten Schritt erfolgte die Erstellung der deskriptiven Statistik für die maternalen Parameter sowohl für die BET- / Kontrollgruppe, als auch unter Berücksichtigung des Gestationsalters (Früh- vs. Reifgeborene). Mithilfe des t-Testes für unabhängige Stichproben wurden die Charakteristika maternales Alter bei Entbindung, Körpergröße, Gewicht und BMI bei Schwangerschaftsfeststellung sowie bei Entbindung auf Unterschiede in den beiden Kohorten untersucht. Aufgrund der rechtsschiefen Verteilung der Angaben zu Gravida / Para fand der Mann-Whitney-U-Test zur Bewertung von

Unterschieden in den beiden Vergleichsgruppen Anwendung. Für die Parameter Ethnizität, Nikotinkonsum, vorzeitiger Blasensprung, antibiotische Therapie und Entbindungsmodus (Spontanpartus vs. Sectio) wurden zunächst Kreuztabellen angelegt und im Anschluss der Chi-Quadrat-Test nach Pearson durchgeführt, um auf einen Zusammenhang zwischen den genannten Parametern und der BET Applikation zu testen. Für alle Analysen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Im zweiten Schritt erfolgte die Datenanalyse der kindlichen Parameter. Zunächst wurden Neugeborene der BET- und Kontrollpopulation bezüglich des Geschlechts und der Frühgeburtlichkeit mithilfe des Pearson-Chi-Quadrat-Test verglichen. Weiterhin wurde ein t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt, um zu ermitteln, ob es einen Unterschied der durchschnittlichen Dauer des Gestationsalters [Tage] bei den Neugeborenen der BET- und Kontrollgruppe gibt. Darüber hinaus wurde im gleichen Testmodus untersucht, ob es signifikante Unterschiede bezüglich der anthropometrischen Faktoren Geburtsgewicht, Körperlänge, Kopfumfang, Ponderal Index nach BET Gabe zwischen den Studiengruppen vorliegen. Auch fand der t-Test für unabhängige Stichproben Verwendung, um zu untersuchen, ob sich der arterielle Nabelschnur-pH zwischen den Neugeborenen der BET und Kontrollgruppe unterscheidet. Aufgrund der linksschiefen Verteilung der APGAR Werte wurde für deren Beurteilung hinsichtlich einer möglichen Einflussnahme der BET Gabe der Mann-Whitney-U-Test genutzt. Für die genannten Testverfahren werden Mittelwerte und Standardabweichung angegeben.

#### 2.5.1. Statistische Analyse der DNA Methylierung

Die statistische Auswertung der genomweiten Assoziationsstudie wurde durch Frau Dr. rer. nat. D. Czamara vom Max Planck Institut für Psychiatrie in München durchgeführt. Zunächst wurde der prozentuale Anteil der methylierten Zellen, der sogenannte beta-Wert ( $\beta$ -Wert), für jedes Sample berechnet. Hierfür wurde die Software *R* bzw. das *R*-Paket *minfi* verwendet. Der  $\beta$ -Wert ist definiert als Quotient aus der Intensität des methylierten Allels (M) / Intensität des unmethylierten Allels (U) + Intensität des methylierten Allels (M) + 100. Der  $\beta$ -Wert liegt zwischen 0 und 1 bzw. 0 und 100%. Das Ergebnis 0 gibt an, dass keine methylierten Moleküle nachweisbar waren. Je mehr sich der  $\beta$ -Wert der Zahl 1 bzw. 100% nähert, desto häufiger können methylierte CpG Sites nachgewiesen werden (139, 140).

Anschließend wurde eine *Subset-quantile Within Array Normalization (SWAN)* (141) durchgeführt. Zwei Samples wurden aufgrund technischer Artefakte ausgeschlossen, sodass insgesamt 137 Proben für die Assoziationsanalysen verwendet werden konnten. Mithilfe des R-Pakets *RefFreeEWAs* (142) erfolgte die Überprüfung der Anzahl der vorliegenden Zelltypen. Hier bestätigte sich, dass nur ein Zelltyp vorliegt. Anhand der anatomischen Lokalisation der Probenentnahmestellen ist von reinem Trophoblastgewebe auszugehen, sodass in den folgenden Analysen eine Korrektur für den Zelltyp entfiel.

Mithilfe von linearen Regressionsanalysen wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der BET Exposition und Veränderungen im Methylierungsprofil der Gene NR3C1, 11 $\beta$ HSD2 und FKBP5 im Plazentagewebe besteht. Als abhängige Variable wurde der  $\beta$ -Wert der jeweilige Methylierungsprobe verwendet. Als Kovariaten wurden das Geschlecht des Kindes, das Gestationsalter, maternales Alter bei Entbindung, Ethnizität (europäisch vs. nicht-europäisch) und mütterlicher Nikotinkonsum verwendet. Anschließend wurde auf geschlechtsspezifische Unterschiede untersucht, indem die Analysen jeweils nur in der weiblichen bzw. männlichen Kohorte durchgeführt worden sind. Im dritten Schritt wurde berechnet, ob Interaktionen zwischen der ANS und dem kindlichen Geschlecht vorliegen. Zusätzlich wurde innerhalb der BET Kohorte untersucht, ob das zeitliche Intervall zwischen ANS und Geburt Einfluss auf die Methylierungsstruktur der Kandidatengene im Plazentagewebe nimmt. Hierfür wurden ebenfalls lineare Regressionsanalysen unter Berücksichtigung der oben genannten Kovariaten erstellt. Alle Assoziationen wurden für multiples Testen über alle Methylierungsproben korrigiert. Hierfür wurde eine *false-discovery-rate* (FDR) nach Benjamini-Hochberg (143) von 0.05 angesetzt.

#### 2.5.2. Statistische Analyse der Telomerlänge

Als abhängige Variable wurde stets die TL verwendet. Zunächst erfolgte für jeden Einflussfaktor jeweils ein Gruppenvergleich mittels t-Test. Im Anschluss wurden multivariate Modelle mithilfe des allgemeinen linearen Modells (SPSS 25, IBM SPSS Statistics, Armonk, New York, USA) erstellt, die für die Kovariaten fetales Geschlecht, Gestationsalter, maternales Alter, präkonzeptioneller BMI, Vorliegen einer Infektion sowie Antibiotikagabe während der Schwangerschaft adjustiert sind, da sie potentiell den

Zusammenhang zwischen intrauterinen Parametern und kindlicher TL konfundieren können (144). Das Signifikanzniveau wurde für alle Analysen bei  $p < .05$  angesetzt.

Im ersten Schritt wurde für den Einflussfaktor BET mittels t-Test für unabhängige Stichproben untersucht, ob sich die mittlere TL in Abhängigkeit von der ANS in den beiden Studienkohorten unterscheidet. Im Anschluss erfolgte die Erstellung eines multivariaten Modells, in dem die Einflussnahme der ANS auf die TL unter Berücksichtigung der oben genannten Kovariaten analysiert worden ist. Analog dazu wurde im zweiten Schritt der Einflussfaktor fetales Geschlecht auf die TL untersucht. Im Anschluss wurde der Einflussfaktor BET unter Berücksichtigung des kindlichen Geschlechts betrachtet. Hierbei fanden zunächst stratifizierte Analysen innerhalb des jeweiligen Geschlechts statt. Im multivariaten Modell wurde dann unter Berücksichtigung der Haupteffekte ANS und kindliches Geschlecht, des Interaktionsterms fetales Geschlecht  $\times$  ANS sowie der oben genannten Kovariaten die Einflussnahme auf die TL untersucht. Zusätzlich zur Haupthypothese wurde im multivariaten Modell unter Berücksichtigung der oben genannten Kovariaten innerhalb der BET Gruppe untersucht, ob der Zeitpunkt der ANS einen Einfluss auf die TL hat.



## **3. Ergebnisse**

### **3.1. Beschreibung der Studienpopulation**

#### **3.1.1. Maternale Parameter**

Die Studiengruppe umfasst insgesamt 139 Frauen, von denen 54 Schwangere (38.8%) die BET bei drohender Frühgeburt erhalten haben. Die häufigsten Ursachen für die stationäre Aufnahme waren eine Zervixinsuffizienz ( $n = 34$ ) und ein vorzeitiger Blasensprung ( $n = 12$ ). Der Kontrollgruppe konnten 85 Frauen (61.2%) zugeordnet werden. Diese Kohorte der Schwangeren stellte sich am häufigsten aufgrund eines vorzeitigen Blasensprungs ( $n = 32$ ), Wehentätigkeit / Geburt ( $n = 17$ ) oder zur geplanten Sectio / Re-Sectio ( $n = 6$ ) vor.

Zwischen den beiden Studiengruppen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der maternalen Faktoren Alter, Körpergröße, Gewicht und BMI vor der Schwangerschaft sowie bei Entbindung. Weiterhin besteht kein Zusammenhang zwischen den Faktoren Ethnizität, Nikotinkonsum, Entbindungsmodus und der BET Gabe. Die Ergebnisse sind konsistent unter Berücksichtigung des Gestationsalters (Früh- vs. Reifgeborene), wie in Tabelle 3 dargestellt. Es ist jedoch festzuhalten, dass Frauen in der BET Kohorte signifikant häufiger eine Antibiotikatherapie erhielten (Chi-Quadrat (1) = 4.294,  $p = .04$ ,  $n = 139$ ). Dieser Effekt zeigt sich nur bei Betrachtung des Gesamtkollektivs.

maternale Parameter	Gesamtkollektiv (n=139)			Frühgeborene (<37+0 SSW) (n= 38)			Reifgeborene (≥ 37+0 SSW) (n=101)		
	Kontrolle (n=85)	BET (n=54)	p-Wert	Kontrolle (n=19)	BET (n=19)	p-Wert	Kontrolle (n=66)	BET (n=35)	p-Wert
Alter bei Entbindung [Jahre]	29.6 ± 5.5	28.5 ± 6.2	.30	29.9 ± 6.1	29.5 ± 6.8	.84	29.5 ± 5.3	28.0 ± 5.8	.20
Körpergröße [cm]	164.2 ± 6.9	166.2 ± 7.2 (n=51)	.12	164.1 ± 7.1	165.8 ± 5.4	.41	164.2 ± 7.0	166.4 ± 8.2 (n=32)	.18
Gewicht vor Schwangerschaft [kg]	64.1 ± 11.4	66.8 ± 14.7	.21	67.6 ± 11.5	67.6 ± 16.7	1.00	63.0 ± 11.2	66.4 ± 13.8	.19
BMI vor Schwangerschaft [kg/m <sup>2</sup> ]	23.8 ± 4.2	24.1 ± 5.1 (n=51)	.64	25.1 ± 4.3	24.6 ± 5.6	.72	23.4 ± 4.1	23.9 ± 4.9 (n=32)	.58
Gewicht bei Entbindung [kg]	78.4 ± 11.3 (n=80)	79.4 ± 16.0 (n=51)	.67	79.2 ± 9.9 (n=17)	77.0 ± 16.1	.63	78.1 ± 11.7 (n=63)	80.8 ± 15.9 (n=32)	.36
BMI bei Entbindung [kg/m <sup>2</sup> ]	29.1 ± 3.9 (n=80)	28.8 ± 5.5 (n=49)	.76	29.7 ± 3.1 (n=17)	28.0 ± 5.4	.27	29.0 ± 4.2 (n=63)	29.4 ± 5.5 (n=30)	.72
Ethnizität									
> europäisch	66 (80.5%)	38 (79.2%)	.86	15 (83.3%)	15 (93.8%)	.35	51 (79.7%)	23 (71.9%)	.39
> nicht-europäisch	16 (19.5%) (n=82)	10 (20.8%) (n=48)		3 (16.7%) (n=18)	1 (6.3%) (n=16)		13 (20.3%) (n=64)	9 (28.1%) (n=32)	
Anzahl Gravidae Median [1. Quartil; 3. Quartil]	2 [1;3]	2 [1;3]	.88	3 [1;3]	2 [1;4]	.80	2 [1;3]	2 [1;3]	.88
Parität Median [1. Quartil; 3. Quartil]	1 [1;2]	1 [1;2]	.22	2 [1;3]	1 [1;2]	.36	1 [1;2]	1 [1;2]	.17
Entbindungsmodus									
> vaginal	60 (70.6%)	42 (77.8%)	.35	15 (78.9%)	16 (84.2%)	.68	45 (68.2%)	26 (74.3%)	.52
> Sectio caesarea	25 (29.4%)	12 (22.2%)		4 (21.1%)	3 (15.8%)		21 (31.8%)	9 (25.7%)	
vorzeitiger Blasensprung	18 (21.2%)	7 (13.0%)	.22	8 (42.1%)	5 (26.3%)	.30	10 (15.2%)	2 (5.7%)	.16
Antibiotikatherapie	14 (16.5%)	17 (31.5%)	<b>.04</b>	7 (36.8%)	9 (47.4%)	.51	7 (10.6%)	8 (22.9%)	.10
Nikotinkonsum	18 (21.2%)	14 (25.9%)	.52	6 (31.6%)	6 (31.6%)	1.00	12 (18.2%)	8 (22.9%)	.57

Tabelle 3: Übersicht der maternalen Parameter

Angaben in Mittelwert ± Standardabweichung bzw. absolute und relative Häufigkeit. Bei Abweichung von der Gesamtanzahl der eingeschlossenen Frauen wurde die Angabe der zur Verfügung stehenden Fälle (n) angegeben. Markiert wurden signifikante Veränderungen ( $p < .05$ ).

### 3.1.2. Kindliche Parameter

In der vorliegenden Arbeit wurden 139 Plazentaprobe ausgewertet. Wie Abbildung 4 zeigt, setzt sich die BET Gruppe aus 29 Mädchen (53.7%) und 25 Jungen (46.3%) zusammen. Die Vergleichsgruppe setzt sich aus 85 Kontrollen (61.2%) zusammen, davon waren 38 Neugeborene weiblich (44.7%) und 47 männlich (55.3%).

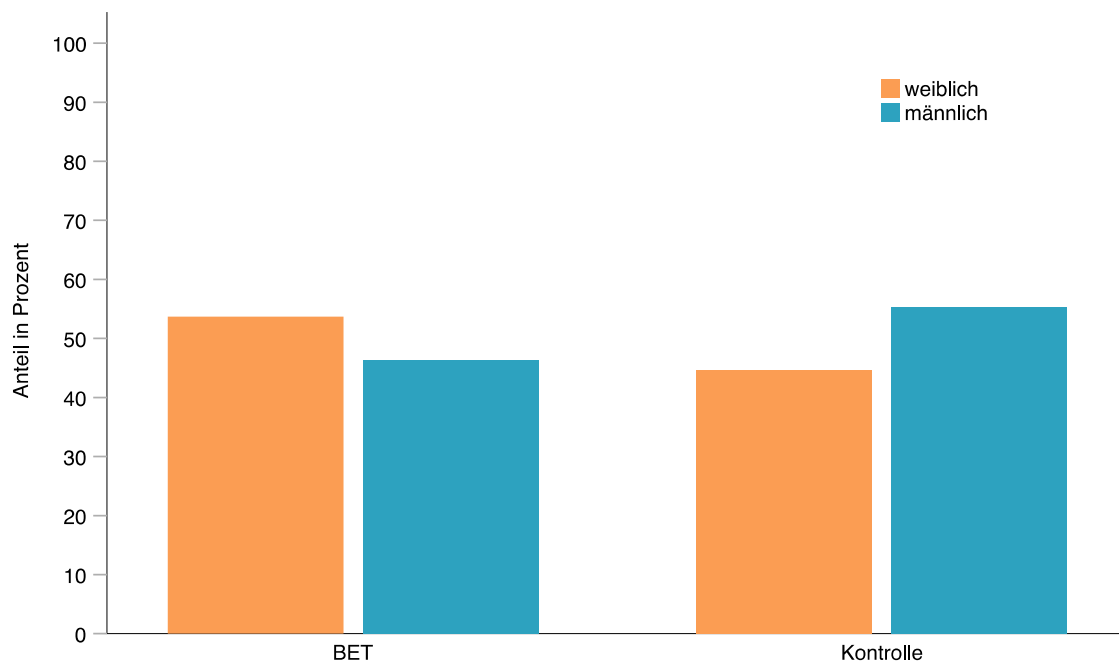


Abbildung 4: Prozentualer Anteil der Geschlechter in der BET- & Kontrollgruppe

Unter Berücksichtigung des Gestationsalters wurden in dieser Sekundäranalyse die Daten von 38 Frühgeborenen (27.3%) und 101 Reifgeborenen (72.7%) ausgewertet. Von den Frühgeborenen haben 19 Neugeborene (35.2%) die Lungenreife mit BET erhalten. Im Vergleich dazu gab es 19 Frühgeborene (22.4%), die diese supportive Therapie nicht erhalten konnten. In der Gruppe der reifgeborenen Kinder hatten 35 Kinder (64.8%) vorab die Indikation zur ANS erfüllt. 66 Neugeborene (77.6%) waren reifgeborenen und bedurften keine Therapie (siehe Abbildung 5). Es besteht kein Zusammenhang zwischen dem kindlichen Geschlecht ( $\chi^2(1) = 1.0, p = .30$ ) bzw. dem Gestationsalter ( $\chi^2(1) = 2.7, p = .10$ ) und der Indikation zur ANS.

Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen dem durchschnittlichen Gestationsalter [Tagen] in den Vergleichsgruppen. In der BET Gruppe betrug das mittlere Gestationsalter  $M = 266.8$  Tage,  $SD = 14.9$ ,  $n = 35$ . Die Mütter der Kontrollgruppe ( $M =$

267.7 Tage,  $SD = 13.1$ ,  $n = 85$ ) waren im Vergleich nicht signifikant länger schwanger ( $t(137) = .382$ ,  $p = .70$ ).

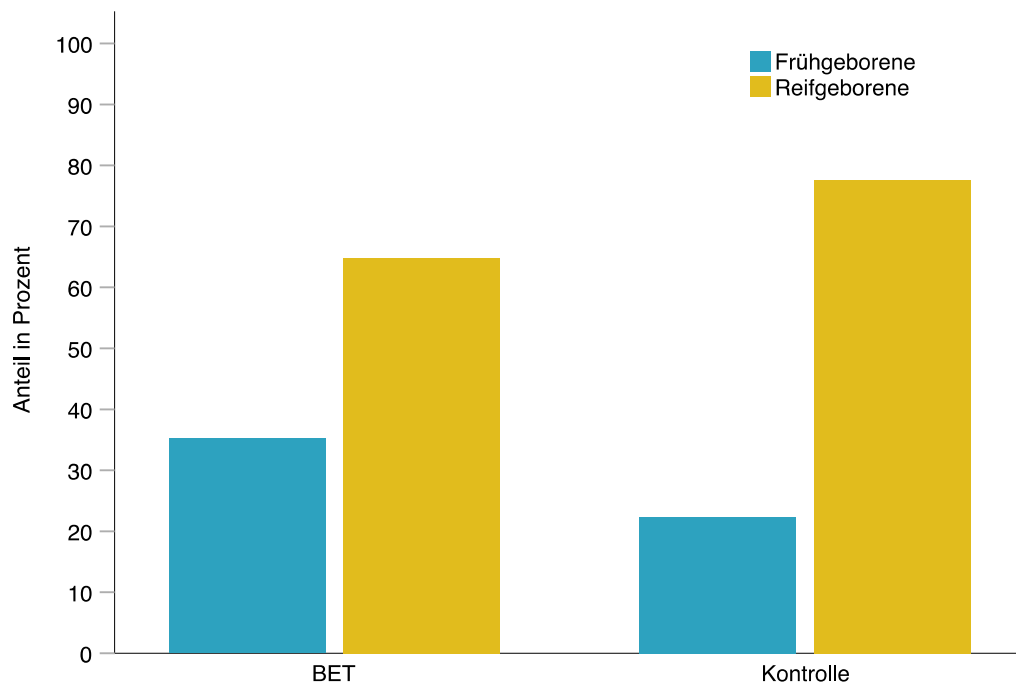


Abbildung 5: Prozentualer Anteil der Früh-/ Reifgeborenen in der BET- & Kontrollgruppe

Im Rahmen der deskriptiven Analyse fällt auf, dass Neugeborene, die die BET Gabe zur Lungenreifeinduktion erhalten haben, einen kleineren Kopfumfang ( $M = 33.5$ ,  $SD = 1.7$ ,  $n = 54$ ) haben, als ihre altersgleichen Kontrollen ( $M = 34.4$ ,  $SD = 1.4$ ,  $n = 85$ ;  $p = .001$ ). Dieser Aspekt wurde in Abbildung 6 veranschaulicht. In Abbildung 7 ist der Effekt auch für die reifgeborenen Kinder dargestellt (BET Gruppe:  $M = 34.0$ ,  $SD = 1.5$ ,  $n = 35$  vs. der Kontrollgruppe:  $M = 34.8$ ,  $SD = 1.2$ ,  $n = 66$ ;  $p = .01$ ). In der Kohorte der Frühgeborenen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Kopfumfanges (BET:  $M = 32.6$ ,  $SD = 1.7$ ,  $n = 19$ ; Kontrolle:  $M = 33.1$ ,  $SD = 1.3$ ,  $n = 19$ ;  $p = .36$ ).

Ebenfalls weisen Frühgeborene der BET Gruppe einen signifikant niedrigeren arteriellen Nabelschnur pH auf ( $M = 7.29$ ,  $SD = 0.6$ ,  $n = 19$ ), als die Frühgeborenen, die der Kontrollgruppe angehören ( $M = 7.33$ ,  $SD = 0.4$ ,  $n = 19$ ;  $p = .03$ ). Bei Betrachtung des Gesamtkollektivs sowie der Subgruppenanalyse der Reifgeborenen ist dieser Effekt nicht reproduzierbar.

Für die Parameter kindliches Geschlecht, Gestationsalter, APGAR nach 1, 5, und 10 Lebensminuten sowie für die anthropometrischen Parameter Körperlänge, Geburtsgewicht und Ponderal Index zeigen sich weder in der Gesamtbetrachtung der Studiengruppen noch in der Analyse der Subgruppen Früh-/ Reifgeborene signifikante Unterschiede. Tabelle 4 gibt einen Überblick über alle kindlichen Parameter.

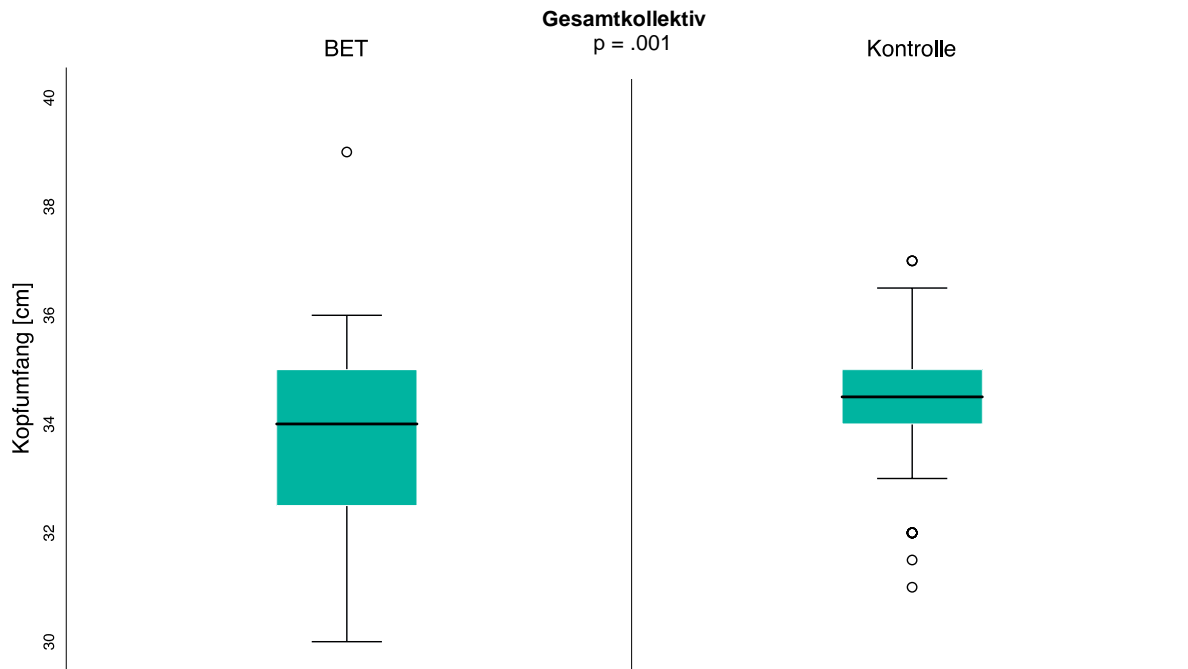


Abbildung 6: Kopfumfang im Gesamtkollektiv für die BET- & Kontrollgruppe

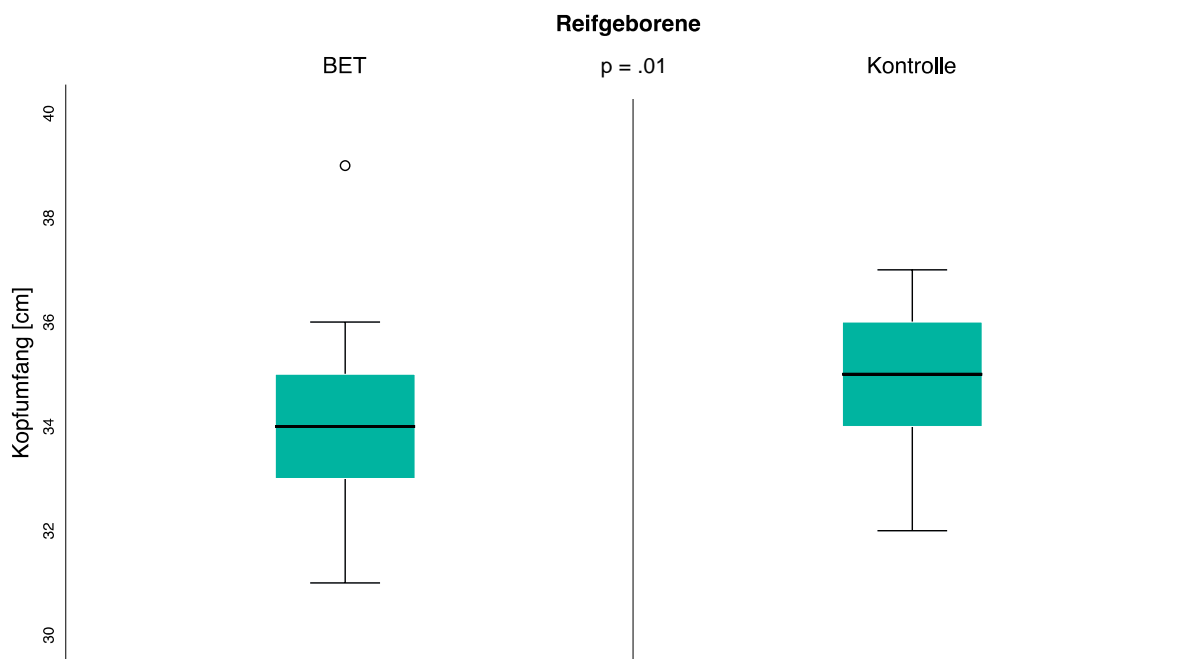


Abbildung 7: Kopfumfang der reifgeborenen Kinder der BET- & Kontrollgruppe

Kindliche Parameter	Gesamtkollektiv (n = 139)			Frühgeborene (<37+0 SSW) (n = 38)			Reifgeborene (≥ 37+0 SSW) (n = 101)		
	Kontrolle (n = 85)	BET (n = 54)	p-Wert	Kontrolle (n = 19)	BET (n = 19)	p-Wert	Kontrolle (n = 66)	BET (n = 35)	p-Wert
Geschlecht									
• weiblich	38 (44.7%)	29 (53.7%)	.30	7 (36.8%)	9 (47.4%)	.51	31 (47.0%)	20 (57.1%)	.33
• männlich	47 (55.3%)	25 (46.3%)		12 (63.2%)	10 (52.6%)		35 (53.0%)	15 (42.9%)	
Gestationsalter [Tage]	267.7 ± 13.1	266.8 ± 14.9	.70	248.6 ± 6.7	250.2 ± 7.5	.51	273.2 ± 8.5	275.8 ± 8.7	.15
Körperlänge [cm]	50.0 ± 2.6	49.7 ± 2.7	.51	47.6 ± 2.0	47.8 ± 2.1	.75	50.7 ± 2.4	50.7 ± 2.4	.97
Kopfumfang [cm]	34.4 ± 1.4	33.5 ± 1.7	<b>.001</b>	33.1 ± 1.3	32.6 ± 1.7	.36	34.8 ± 1.2	34.0 ± 1.5	<b>.01</b>
Geburtsgewicht [g]	3194.4 ± 434.8	3093.0 ± 544.6	.25	2716.8 ± 313.9	2695.0 ± 431.9	.86	3331.8 ± 362.2	3309.0 ± 476.6	.79
Ponderal-Index	2.6 ± .25	2.5 ± .24	.21	2.5 ± .16	2.5 ± .25	.40	2.6 ± .28	2.5 ± .22	.43
Nabelschnur pH	7.29 ± .07 (n = 84)	7.29 ± .06 (n = 53)	.95	7.33 ± .04	7.29 ± .06	<b>.03</b>	7.27 ± .07 (n = 65)	7.28 ± .06 (n = 34)	.51
APGAR nach 1 min (Median [1. Quartil; 3. Quartil])	9 [9;9]	9 [9;9]	.68	9 [9;9]	9 [8;9]	.54	9 [9;9]	9 [9;9]	.88
APGAR nach 5min (Median [1. Quartil; 3. Quartil])	10 [10;10] (n = 84)	10 [9;10]	.18	10 [9;10] (n = 18)	10 [9;10]	.37	10 [10;10]	10 [10;10]	.59
APGAR nach 10min (Median [1. Quartil; 3. Quartil])	10 [10;10] (n = 84)	10 [10;10]	.16	10 [10;10] (n = 18)	10 [10;10]	1.0	10 [10;10]	10 [10;10]	.09

*Tabelle 4: Übersicht der kindlichen Parameter*

*Angabe in Mittelwert ± Standardabweichung bzw. absolute und relative Häufigkeit. Bei Abweichung von der Gesamtanzahl der berücksichtigten Kinder wurde die Angabe der zur Verfügung stehenden Fälle (n) angegeben. Markiert wurden signifikante Veränderungen ( $p < .05$ ).*

### 3.2. DNA Methylierungen

In den folgenden Darstellungen finden die Daten von 137 Plazenten Berücksichtigung. Es wurden insgesamt 162 CpGs für die oben genannte Hypothese ausgewertet. Eine Übersicht aller Ergebnisse der Regressionsanalysen findet sich gegliedert nach den drei Kandidatengenen im Anhang in den Tabellen 6 - 9. Alle Assoziationen der vorliegenden genomweiten Assoziationsstudie wurden für multiples Testen über alle Methylierungsproben korrigiert. Hierfür wurde eine *false-discovery-rate* (FDR) nach Benjamini-Hochberg von 0.05 angesetzt. Alle Analysen sind adjustiert für das kindliche Geschlecht, das Gestationsalter, maternales Alter bei Entbindung, Ethnizität (europäisch vs. nicht-europäisch) und maternalen Nikotinkonsum.

#### 3.2.1. Einflussfaktor: BET

Um den Einfluss der BET Gabe zu untersuchen, sind 89 CpGs des **NR3C1 Gens** auf Chromosomen 5 analysiert worden. Infolge der ANS ergaben sich für das NR3C1 Gen keine signifikanten Veränderungen im Methylierungsprofil nach FDR Korrektur (alle p-Werte nach FDR Korrektur  $\geq .63$ ).

Die Analyse der 23 CpG sites des **11 $\beta$ HSD2 Gens** bezüglich eines potentiellen Einflusses der antenatalen BET Exposition ergab ebenfalls keine signifikanten Adaptationen des Methylierungsausmaßes nach FDR Korrektur (alle p-Werte nach FDR Korrektur  $\geq 1$ ).

Während wir bei den vorherigen Genen keine Signifikanzen feststellen konnten, ließ sich, wie in Abbildung 8 dargestellt, in der Analyse des **FKBP5 Gens** in der CpG site cg22363520 (Chromosomen 6, Basenpaarposition 35558488) unter Berücksichtigung der Kovariaten kindliches Geschlecht, Gestationsalter, maternales Alter, maternaler Nikotinkonsum und Ethnizität eine signifikante Hypomethylierung nachweisen (p-Wert nach FDR Korrektur =  $3.78 \times 10^{-05}$ ). Wie Abbildung 9 zeigt, ist dieser Effekt gleichermaßen bei männlichen (p-Wert nach FDR Korrektur =  $1.7 \times 10^{-5}$ ), als auch weiblichen Neugeborenen (p-Wert nach FDR Korrektur =  $2.1 \times 10^{-6}$ ) zu beobachten. Insgesamt wurden im Rahmen der Analyse 50 CpGs des FKBP5 Gens untersucht.

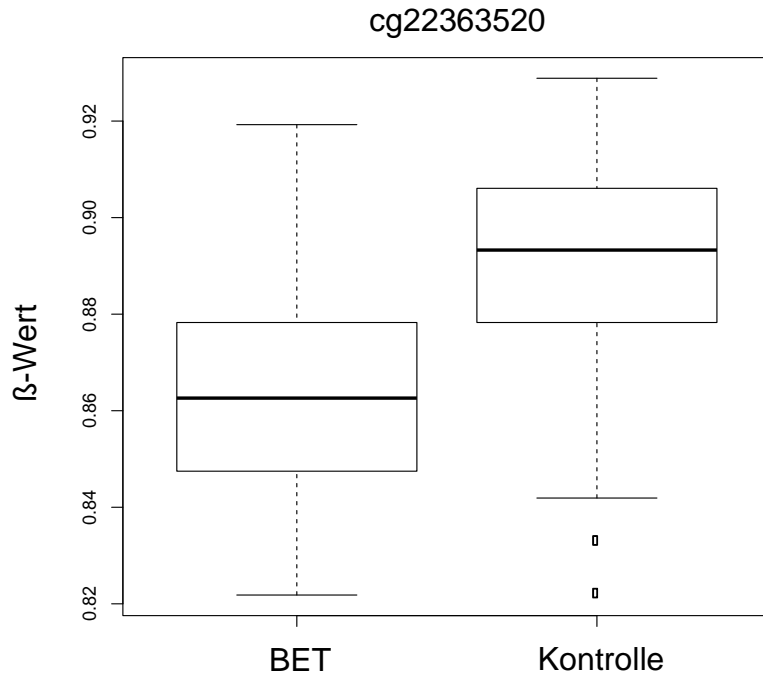


Abbildung 8: DNA Methylierung der CpG Site cg223635209 des FKBP5-Gens in der BET- & Kontrollgruppe

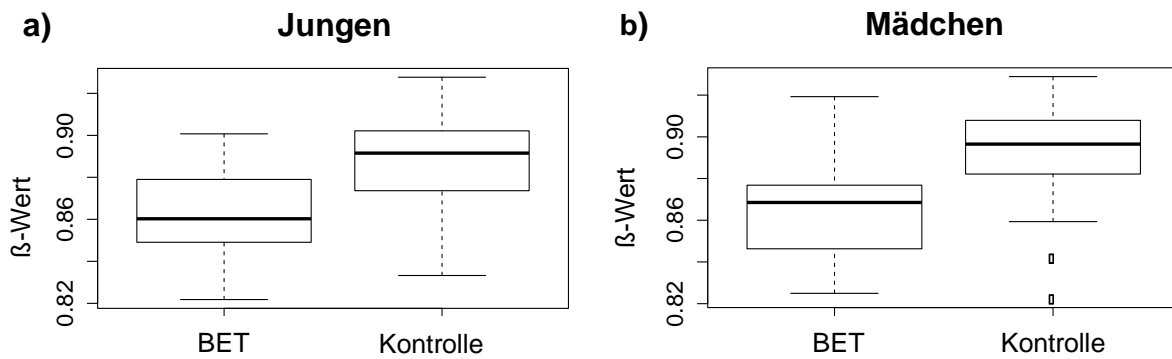


Abbildung 9: DNA Methylierung der CpG Site cg223635209 des FKBP5-Gens a) aller Jungen und b) aller Mädchen



### 3.2.2. Einflussfaktor: kindliches Geschlecht

Soweit im Rahmen der Analyse der 89 CpGs des **NR3C1 Gens** beurteilbar, kann ein Einfluss des kindlichen Geschlechts auf die DNA Methylierung des Kandidatengens ausgeschlossen werden (alle p-Werte nach FDR Korrektur  $\geq .33$ ).

Dem gegenüber konnte in zwei der 23 getesteten CpGs des **11 $\beta$ HSD2 Gens** eine Hypermethylierung bei den Mädchen nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 10 & 11 dargestellt, zeigte sich sowohl im Locus cg24270678 (Chromosomen 16, Basenpaarposition 67465029) eine signifikante Hypermethylierung (p-Wert nach FDR Korrektur = .01), als auch in der CpG Site cg13678281 (Chromosomen 16, Basenpaarposition 67466470, p-Wert nach FDR Korrektur = .001).

In den analysierten CpGs des **FKBP5 Gens** ließen sich kein Einfluss des kindlichen Geschlechts auf das DNA Methylierungsprofil nachweisen (alle p-Werte nach FDR Korrektur  $\geq 1$ ).

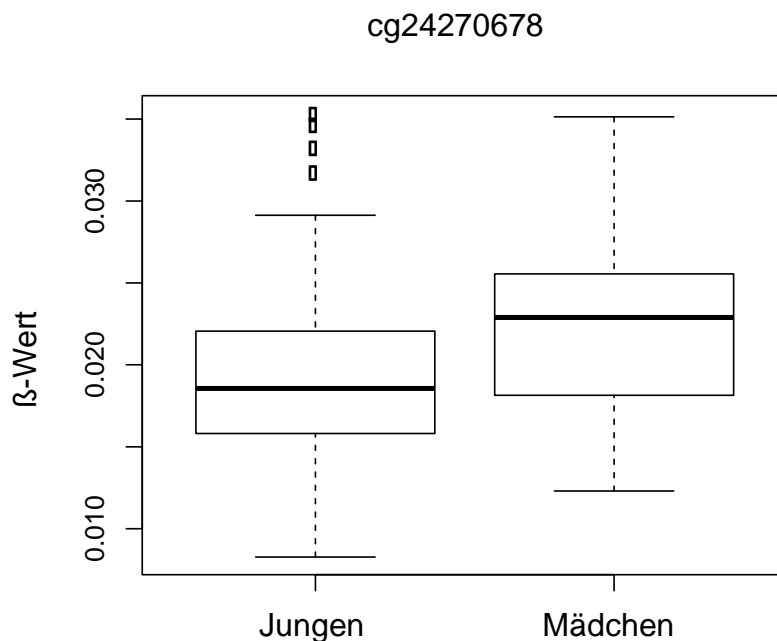


Abbildung 10: Methylierung der CpG Site cg24270678 des 11 $\beta$  HSD2 Gens bei Jungen & Mädchen

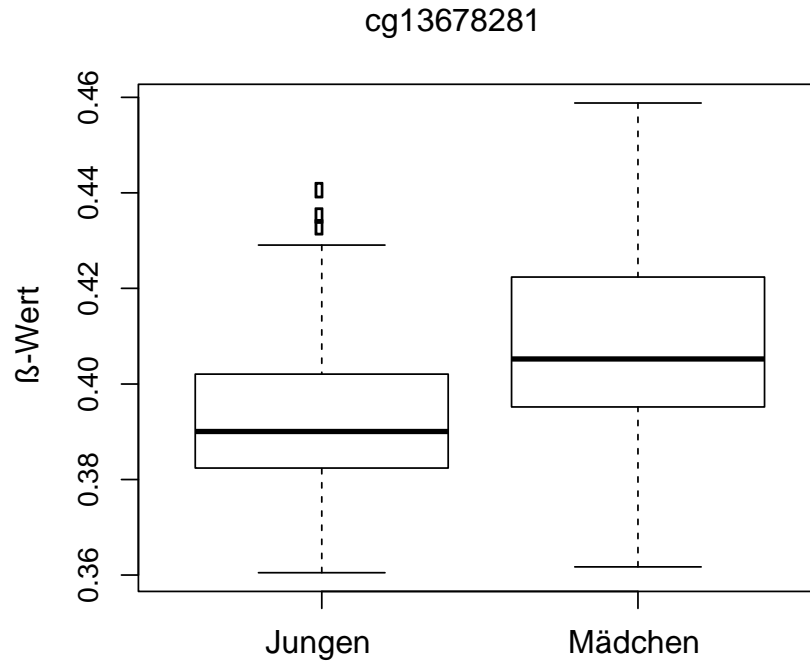


Abbildung 11: Methylierung der CpG Site cg13678281 des 11 $\beta$  HSD2 Gens bei Jungen & Mädchen

### 3.2.3. Einflussfaktor: BET unter Berücksichtigung des kindlichen Geschlechts

In der vorliegenden Arbeit kann kein Einfluss des Interaktionsterms BET  $\times$  kindliches Geschlecht im Methylierungsprofil der untersuchten CpGs im **NR3C1 Gen** gefunden werden (alle p-Werte nach FDR Korrektur  $\geq 1$ ).

Auch in der Analyse des **11 $\beta$ HSD2 Gens** ergeben sich unter Berücksichtigung der Interaktionseffekte von antenataler GC Gabe und kindlichem Geschlecht keine signifikante Veränderungen in der Methylierungsstruktur der untersuchten CpGs (alle p-Werte nach FDR Korrektur  $\geq 1$ ).

Des Weiteren lassen sich auch im **FKBP5 Gen** keine signifikanten Veränderungen im Methylierungsprofil unter Berücksichtigung von möglichen Interaktionen zwischen BET und kindlichem Geschlecht nachweisen (alle p-Werte nach FDR Korrektur  $\geq 1$ ).

### 3.2.4. Einflussfaktor: Zeitpunkt der ANS

Zusätzlich zur Haupthypothese wurde der Einflussfaktor Zeitpunkt der ANS innerhalb der BET Kohorte untersucht. In keinem der Kandidatengene ließen sich signifikante Adaptationen des Methylierungsprofils nach multiplen Testen nachweisen (alle p-Werte nach FDR Korrektur  $\geq 1$ ).

### 3.3. Analysen der Telomerlänge

Für alle im folgenden dargestellten Einflussfaktoren erfolgt zunächst die Beschreibung der jeweiligen Gruppenvergleiche ohne Adjustierung. Im Anschluss werden jeweils multivariate Analysen präsentiert. Hierbei wurde für die Kovariaten fetales Geschlecht, Gestationsalter, maternales Alter, präkonzeptioneller BMI, Vorliegen einer Infektion sowie Antibiotikagabe während der Schwangerschaft kontrolliert, da diese Faktoren potentiell einen konfundierenden Einfluss auf die untersuchten Zusammenhänge haben können (144).

#### 3.3.1. Einflussfaktor: BET

Der Gruppenvergleich zeigt, dass sich die TL in der BET Gruppe ( $M = 1.02$  [T/S],  $SD = .22$ ,  $n = 53$ ) nicht signifikant von der TL in der Kontrollgruppe ( $M = 1.02$  [T/S],  $SD = .25$ ,  $n = 80$ ) unterscheidet ( $t(131) = .03$ ,  $p = .98$ ).

Dementsprechend ist auch im multivariaten statistischen Modell kein signifikanter Effekt der ANS auf die TL nachweisbar ( $F(1,128) = .01$ ,  $p = .92$ ,  $n = 130$ ).

#### 3.3.2. Einflussfaktor: kindliches Geschlecht

Bei der isolierten Untersuchung der Einflussnahme des kindlichen Geschlechts auf die TL, fällt auf, dass Jungen kürzere Telomere ( $M = .98$  [T/S],  $SD = .24$ ,  $n = 68$ ) aufweisen, als ihre weiblichen Altersgenossinnen ( $M = 1.06$  [T/S],  $SD = .24$ ,  $n = 65$ ),  $t(131) = 1.9$ ,  $p = .06$ . Im multivariaten Modell ist ein signifikanter Effekt des fetalen Geschlechts auf die TL nachweisbar ( $F(1,128) = 4.69$ ,  $p = .03$ ,  $n = 130$ ).

#### 3.3.3. Einflussfaktor: BET unter Berücksichtigung des kindlichen Geschlechts

Es erfolgte zunächst die Bewertung des BET Einflusses stratifiziert nach dem kindlichen Geschlecht. Im paarweisen, intrageschlechtlichen Vergleich ist in den Studiengruppen kein signifikanter Unterschied der TL bei den Mädchen zwischen der BET- und Kontrollgruppe darstellbar (BET:  $M = 1.02$  [T/S],  $SD = .24$ ,  $n = 28$ ; Kontrolle:  $M = 1.09$  [T/S],  $SD = .24$ ,  $n = 37$ ;  $p = .21$ ). Die Analyse der männlichen Probanden ergibt ebenfalls keinen signifikanten Unterschied der TL in den genannten Vergleichsgruppen (BET:  $M = 1.02$  [T/S],  $SD = .21$ ,  $n = 25$ , Kontrolle:  $M = .96$  [T/S],  $SD = .25$ ,  $n = 43$ ;  $p = .28$ ).

Wie Abbildung 12 zeigt, kommt es unter dem Einfluss der BET Gaben deskriptiv zu einer Zunahme der TL bei den Jungen, sodass sich insgesamt die TL zwischen den Geschlechtern angleicht (Mädchen:  $M = 1.02$ ;  $SD = .24$ ,  $n = 28$ ; Jungen:  $M = 1.02$ ;  $SD = .21$ ;  $n = 25$ ;  $p = .95$ ).

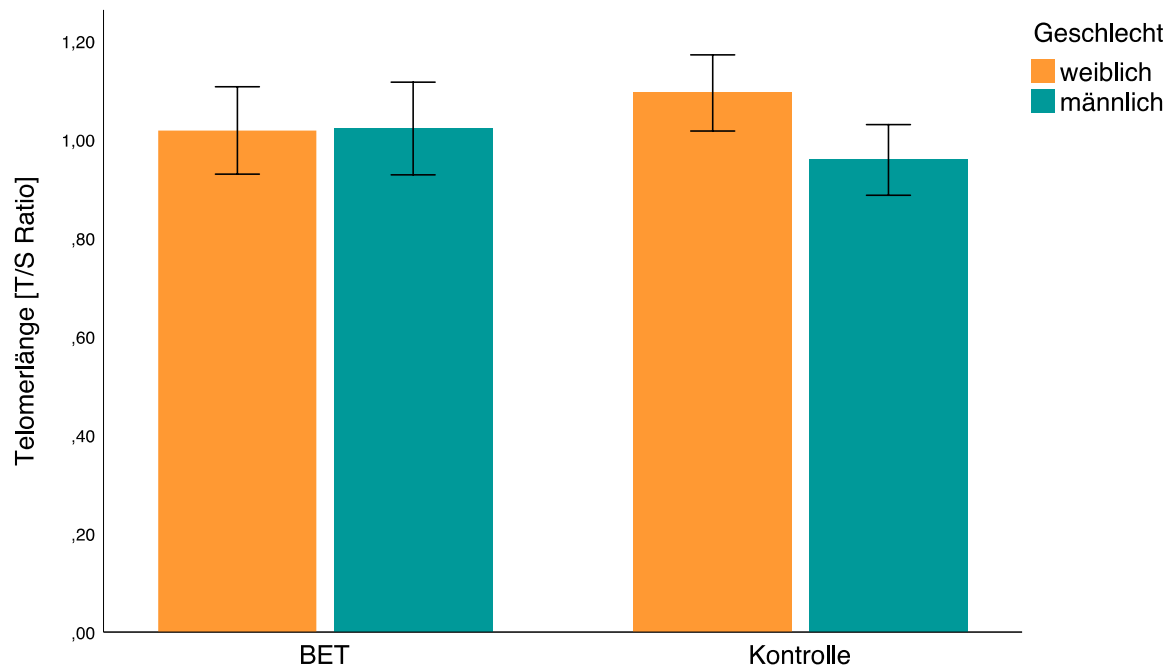


Abbildung 12: Telomerlänge in der BET- & Kontrollgruppe stratifiziert nach dem kindlichen Geschlecht

Zusätzlich zu den stratifizierten Berechnungen erfolgte auch eine multivariate Analyse mit dem Interaktionsterm fetales Geschlecht  $\times$  ANS. Hier konnte unter Berücksichtigung des Interaktionsterms, den Haupteffekten fetales Geschlecht und ANS sowie den oben genannten Kovariaten jedoch kein signifikanter Einfluss des Interaktionsterms auf die TL nachgewiesen werden ( $F(3,126) = 3.02$ ,  $p = .09$ ;  $n = 130$ ). Tabelle 5 zeigt die statistischen Kennwerte für dieses Modell.

<b>Prädiktor</b>	<b>Freiheitsgrade (df)</b>	<b>F-Test</b>	<b>p-Wert</b>
Geschlecht	1	2.83	.10
ANS	1	.02	.88
fetales Geschlecht x ANS	1	3.02	.09
maternales Alter	1	1.29	.26
präkonzeptioneller BMI	1	.02	.90
Gestationsalter	1	.39	.54
Infektion	1	2.76	.10
Antibiose	1	2.54	.11

*Tabelle 5: Multivariate Analyse mit dem Interaktionsterm fetales Geschlecht x ANS*

*Statistische Kennwerte für das Modell, das den Einfluss des Interaktionsterms fetales Geschlecht x ANS unter Berücksichtigung der Haupteffekte und Kovariaten auf die TL beschreibt*

### 3.3.5. Einflussfaktor: Zeitpunkt der ANS

Zusätzlich zur Haupthypothese wurde der Einfluss des Zeitpunktes der ANS während der Schwangerschaft unter Berücksichtigung der oben genannten Kovariaten in der BET Gruppe auf die TL untersucht. Für den Zeitpunkt der ANS ist kein signifikanter Einfluss auf die TL ( $F(33,16) = .26, p = 1.00, n = 50$ ) nachweisbar.

## **4. Diskussion**

Das Forschungsfeld der perinatalen Programmierung bietet einen möglichen Erklärungsansatz für die Transmission früher Umweltfaktoren auf das ungeborene Kind und dessen Gesundheit im weiteren Lebensverlauf. Es wird angenommen, dass die Effekte dieser intrauterinen Faktoren durch die Aktivierung der maternalen und kindlichen HHNA vermittelt werden, was letztendlich in einer gesteigerten Kortisolexposition des Feten resultiert. Aktuelle Studien zeigen vielfältige Auswirkungen einer erhöhten GC Exposition auf den heranwachsenden Feten. So kann eine verstärkte GC Exposition eine Wachstumsrestriktion sowie negative Langzeiteffekte für die physische und psychische Gesundheitsentwicklung bewirken. Aktuell ist nicht abschließend geklärt, welche Mechanismen auf molekularbiologischer Basis im Sinne der perinatalen Programmierung die Langzeiteffekte einer übermäßigen GC Exposition übertragen bzw. verursachen. Als mögliche Erklärungsansätze werden sowohl epigenetische Veränderungen, vor allem Hyper- / Hypomethylierungen, als auch Modifikationen der TL diskutiert.

In der Geburtsmedizin finden synthetische GC regelmäßig in Form von Betamethason im Rahmen der ANS bei drohender Frühgeburt Anwendung. Diese Therapie führte zu einer deutlichen Reduktion der perinatalen Morbidität und Mortalität. Insbesondere unter Berücksichtigung der medizinisch indizierten BET Gaben zur Lungenreifeinduktion ist es für Geburtsmediziner und Eltern wichtig zu klären, welche Folgen diese Therapieoption für das Neugeborene langfristig haben könnte und welche geschlechtsspezifischen Unterschiede zu beachten sind.

In der vorliegenden Studie wurde erstmals der Einfluss der pränatalen GC Exposition am Beispiel der ANS auf das Methylierungsprofil der glukokortikoid-responsiven Gene NR3C1, 11 $\beta$ HSD2, FKBP5 und der TL in humanem Plazentagewebe unter Berücksichtigung geschlechtsspezifischer Aspekte untersucht. Hierbei zeigte sich bei beiden Geschlechtern nach BET Gabe ein signifikant geringeres Methylierungsausmaß im Locus cg22363520 des FKBP5 Gens. Sowohl für die Gene NR3C1 und 11 $\beta$ HSD2, als auch die TL ließen sich keine signifikanten Veränderungen nach der pränatalen BET Exposition im Plazentagewebe nachweisen.

## 4.1. Einfluss der BET Exposition auf die DNA Methylierung der Kandidatengene

### 4.1.1. NR3C1 Gen

Das Gen NR3C1 kodiert für den GR, der insbesondere durch die Bindung des freien Kortisols im Rahmen der HHNA Aktivierung eine zentrale Rolle bei der Transmission der GC vermittelten Signalwege einnimmt. Die Methylierung des NR3C1 Gens geht mit einer reduzierten GR Expression einher. Infolgedessen zirkuliert mehr Kortisol, da weniger Bindungskapazitäten gegeben sind, und die negative Feedbackschleife kann nicht ausgelöst werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Einfluss der GC Exposition am klinischen Beispiel der ANS auf den Methylierungsstatus des NR3C1 Gens in humanem Plazentagewebe untersucht. Weder bei der Betrachtung des BET Einflusses bzw. des kindlichen Geschlechts, noch bei Berücksichtigung der in Abschnitt 3.2. genannten Kovariaten zeigten sich signifikante Veränderungen im Methylierungsprofil der 89 untersuchten CpGs des Kandidatengens NR3C1.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann diskutiert werden, dass die BET Gabe zur Lungenreifeinduktion lediglich eine kurzfristige Dysbalance im GC Haushalt darstellt und daher keinen und / oder keinen langanhaltenden Effekt auf das DNA Methylierungsprofil des GR in humaner Plazenta hat. Bisher wurden vor allem Auswirkungen einer chronischen Stressexposition während der Schwangerschaft untersucht. Beispielsweise konnte eine Assoziation zwischen einer langfristigen pränatalen Stressexposition in Form einer maternalen Depression und einer reduzierten Expressionsrate des GR in der Plazenta aufgezeigt werden (145, 146). Im Mausmodell beschreiben *Mueller* und *Bale*, dass sowohl der Zeitpunkt der pränatalen Stressexposition, als auch das fetale Geschlecht Einfluss auf die neurobiologische Entwicklung und das Verhalten nehmen. So weisen nur männliche Mäusejungen nach früher Stressexposition depressive Symptome sowie eine erhöhte Stressreaktivität auf (147). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Neugeborene von Müttern, die im 2. Trimenon vermehrt Stress erfahren hatten, eine reduzierte Selbstregulierung, einen verminderten Muskeltonus und eine ausgeprägtere Lethargie aufwiesen (148). Als einen Transmissionsmechanismus weisen die Wissenschaftler eine verstärkte Methylierung des NR3C1 Gens und eine konsekutiv verminderte GR Expression nach

(147). Folglich bleibt das negative Feedback aus und es kommt zu einer dysregulierten HHNA - Aktivität und erhöhten Kortisolspiegeln (149).

#### 4.1.2. 11 $\beta$ HSD2

Das in der Plazenta lokalisierte 11 $\beta$ HSD2 Enzym spaltet Kortisol in seine inaktiven Metaboliten. Eine chronische präpartale Stressexposition ist mit einer verstärkten Methylierung des 11 $\beta$ HSD2 Gens assoziiert und geht mit einer reduzierten Genexpression und somit einer verminderten Anzahl von 11 $\beta$ HSD2 Enzymen einher (148, 150). In der Konsequenz besteht eine höhere fetale Kortisolexposition in utero.

In der vorliegenden Studie wurde der Effekt der ANS im Rahmen der Lungenreifeinduktion auf die DNA Methylierung des 11 $\beta$ HSD2 Gens in humanem Plazentagewebe untersucht. Parallel zu den Ergebnissen des NR3C1 Gens war die GC Exposition nicht mit signifikanten Veränderungen im Methylierungsstatus der 23 untersuchten CpGs des 11 $\beta$ HSD2 Gens assoziiert. Bei der isolierten Betrachtung des kindlichen Geschlechts fiel auf, dass Mädchen in zwei CpG Sites (cg13678281; cg24270678) einen signifikant höheren Methylierungsgrad aufwiesen, als die männlichen Neugeborenen. Anhand des Ergebnisses kann diskutiert werden, dass weibliche Feten in utero einer höheren Kortisolexposition aufgrund der reduzierten Anzahl von 11 $\beta$ HSD2 Enzymen infolge der Hypermethylierung der zwei Genloki ausgesetzt sind. Infolgedessen müsste in weiteren Studien untersucht werden, ob weibliche Feten / Neugeborene potentiell sensibler auf exogene Kortisoleinflüsse reagieren.

Bezugnehmend auf die aktuelle Literatur stehen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit teilweise im Widerspruch. Beispielsweise zeigen *Jensen Pena et al.* im Tiermodell (Ratte) eine signifikante Reduzierung der 11 $\beta$ HSD2 mRNA im Plazentagewebe im Rahmen einer anhaltenden maternalen Stressbelastung. Als Ursache wird eine verstärkte DNA Methylierung im Promotorenbereich der 11 $\beta$ HSD2 aufgezeigt (150). *Paquette et al.* bestätigen ähnliche Beobachtungen in einer Humanstudie. Diese Arbeitsgruppe berichtet von Assoziationen zwischen Methylierungen im Promotorenbereich des 11 $\beta$ HSD2 Gens, einer verminderten 11 $\beta$ HSD2 Expression und erhöhten Stressanzeichen beim Neugeborenen im Sinne



einer leichteren Erregbarkeit, Aufmerksamkeitsschwäche und einem reduzierten Muskeltonus (151). Auch *Monk et al.* beschreiben Veränderungen in der neurobehavioralen Entwicklung im Sinne einer verzögerten motorischen Entwicklung, Lernschwierigkeiten sowie einer erhöhten Emotionalität infolge einer verstärkten Kortisolexposition in utero durch Methylierung des 11 $\beta$ HSD2 Gens bei Frauen mit einem gesteigerten Stresserleben (148). Dennoch gibt es auch Studien, die keine Assoziation zwischen einer pränatalen Stresserfahrung in Form einer maternalen Depression und der 11 $\beta$ HSD2 Expressionsrate belegen können. *Reinolds et al.* untersuchten in ihrer Arbeit den Einfluss einer maternalen Depression unter Berücksichtigung des Gestationsalters auf die Plazentafunktion. Frauen mit einer ausgeprägten depressiven Symptomatik während der Schwangerschaft wiesen zwar mehr GR mRNA auf, jedoch ließ sich der Effekt für die 11 $\beta$ HSD2 nicht nachweisen (146). Es gilt zu berücksichtigen, dass bei den zitierten Studien unterschiedliche Stressformen (z.B. subjektives Stressempfinden, maternale Depressionen) sowie Methoden zur Quantifizierung von Stress (Fragebögen, Kortisolbestimmung im Speichel der Mutter, Assessment Tests für Neugeborene) Anwendung fanden. Weiterhin gilt zu beachten, dass die unterschiedlichen Sequenzierungstechniken des Plazentamaterials Einfluss auf die Auswertung der Methylierungsergebnisse haben könnten. Im Vergleich zur vorliegenden Arbeit wurde nie der Einfluss einer exogenen GC Exposition ausgewertet, sondern Situationen, die mit einem erhöhten Stresserleben für Mutter und Kind assoziiert sind, analysiert.

#### 4.1.3. FKBP5

FKBP5 reguliert als sogenanntes Co-Chaperon die Funktion des GR. Es reduziert die Bindungsaffinität des GR und verhindert so die nukleare Translokation, was zu einer verminderten biologischen Wirkung des GR führt (152, 153). Epidemiologische Studien zeigen, dass v.a. die Kombination aus bestimmten genetischen Varianten des FKBP5 Gens und stressinduzierte DNA Methylierung von FKBP5 (z.B. im Rahmen von Missbrauch oder frühen Traumaerfahrungen) zu einem erhöhten Risiko für stressinduzierte psychiatrische Erkrankungen, wie eine posttraumatische Belastungsstörung, Depression oder Suizidalität führen können (153, 154).

In der vorliegenden Studie zeigt sich nach pränataler GC Exposition ein signifikant geringeres Methylierungsausmaß im Locus cg22363520 des FKBP5 Gens. Sowohl

bei Mädchen, als auch Jungen zeigt sich die gleiche Effektrichtung, sodass geschlechtsspezifische Unterschiede ausgeschlossen werden können.

Entsprechend den Erkenntnissen von *Wiechmann et al.* konnten wir ebenfalls GC abhängige Veränderungen im Methylierungsprofil im FKBP5 Gens nachweisen (155), wobei zu berücksichtigen gilt, dass in der genannten Studie Dexamethason bzw. die Testung an peripheren Blutzellen sowie Mundschleimhautzellen vollzogen worden ist. Die von uns beschriebene signifikante Hypomethylierung liegt in der Basenpaarposition 35558488, die im Intron 7 auf Chromosomen 6 lokalisiert ist. Eine Methylierung im Intron 7 nimmt eine zentrale Steuerungsfunktion ein. Aufgrund der Lokalisation des Introns 7 am Transkriptionsstartpunkt des FKBP5 Gens, kann es im Rahmen einer Methylierung eine Veränderung des FKBP5 Expression herbeiführen (153, 154). Die Daten von *Klengel et al.* lassen die Schlussfolgerung zu, dass eine Hypomethylierung in bestimmten CpGs, die im Intron 7 des FKBP5 Gens lokalisiert sind, mit einer verstärkten FKBP5 Expression assoziiert sind. Infolgedessen wird die Sensitivität des GR bzw. seine biologische Wirkung reduziert (154). Unter Berücksichtigung der spezifischen Allelausstattung des FKBP5 Gens konnten auch *Paquette et al.* zeigen, dass eine Hypomethylierung in zwei CpGs im Intron 7 des FKBP5 Gens negativ mit der FKBP5 Expressionrate korreliert (153).

FKBP5 wird u.a. in der Plazenta gebildet, wobei aktuell die funktionelle Relevanz sowie das epigenetische Potential in der fetalen Entwicklung noch unzureichend erforscht sind (153). Welche Auswirkung eine reduzierte GR Sensitivität in der Plazenta nach antenateler GC Exposition hat, muss in weiteren Longitudinalstudien erforscht werden. Es kann jedoch durchaus diskutiert werden, ob es sich hierbei um einen potentiellen Schutzmechanismus vor zu hohen intrauterinen GC Konzentrationen handelt. Dem gegenüber steht aber auch die Möglichkeit eines systemischen Effekts, d.h. in allen fetalen Geweben, inklusive den Immunzellen, würde eine verminderte GC Sensitivität vorliegen. Als Kompensationsmechanismus könnte eine dauerhaft gesteigerte Kortisolproduktion die Folge sein. Die Annahme wird durch die Arbeit von *Alexander et al.* gestützt. Diese Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass Kinder, deren Mütter bei drohender Frühgeburt die ANS erhalten hatten, noch im Alter von 6-11 Jahren eine erhöhte Kortisol Reaktivität aufwiesen (156). Folglich kann geschlussfolgert werden, dass die präpartale GC Exposition bereits frühzeitig zur Programmierung der HHNA-

Aktivität führt. In Zusammenschau mit diesen sowie unseren Daten kann aufgrund der gestörten ultrakurzen negativen Feedbackschleife eine länger andauernde Kortisolexposition in Stresssituationen die Folge sein. Hierbei könnte es sich um einen langfristigen Programmierungseffekt handeln, sodass diese Kinder sensibler für Stresserfahrungen wären und langfristig ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung stressbedingter Erkrankungen bei entsprechender Gen-Umwelt-Interaktion bürden könnten.

#### 4.1.4. Einflussfaktor: Zeitpunkt ANS

Weder im Methylierungsprofil des NR3C1, des 11 $\beta$ HSD2 Gens, noch im FKBP5 Gen ließen sich Effekte für das Intervall zwischen dem Zeitpunkt der ANS und der Geburt nachweisen. Dennoch sollte dieser Aspekt in zukünftigen Studien mit einer erweiterten Stichprobengröße nicht vernachlässigt werden.

## 4.2. Auswirkung der ANS auf die Telomerlänge

Die TL Neugeborener stellt eine Art Grundeinstellung der Zellresilienz dar, die sukzessive über die Lebensspanne abnimmt. Studien zeigen eine Korrelation zwischen einer erniedrigten TL und einer erhöhten Inzidenz altersbedingter chronischer Erkrankungen, wie Diabetes mellitus, Adipositas, kardiovaskuläre Erkrankungen und letztendlich einer erhöhten Mortalität auf (104, 123). Die TL bei der Geburt scheint ein wichtiger Einflussfaktor für die TL über die Lebensspanne darzustellen und kann deshalb als Vulnerabilitätsmarker für altersbedingte Erkrankungen im frühen Leben betrachtet werden (104, 112). Es wird eine stetig wachsende Anzahl von Risikofaktoren identifiziert, welche in der Pränatalperiode eine Verkürzung der Telomere begünstigen (104, 124, 144).

Hinsichtlich potentieller Programmierungseffekte einer exogenen GC Exposition am Beispiel der ANS postulierten wir eine negative Korrelation zwischen BET Gaben und der TL, wobei geschlechtsspezifische Modulationen zu berücksichtigen seien.

Die von uns aufgestellte Hypothese bestätigte sich nicht. Bei Betrachtung des Haupteffekts der ANS waren keine signifikanten Veränderungen der TL nachweisbar. Im Rahmen der multivariaten Analyse zeigt sich, dass das fetale Geschlecht einen signifikanten Einfluss auf die TL hat. Hierbei weisen Mädchen tendenziell längere Telomere auf, als Jungen. Unter dem Einfluss der ANS gleicht sich die Telomerlänge

zwischen den Geschlechtern an. Wird die weibliche Kohorte isoliert betrachtet, kann tendenziell eine Verkürzung der TL nach Erhalt der Lungenreife beschrieben werden, wobei der Effekt nicht signifikant ist. Genau entgegengesetzt ist der Trend bei den männlichen Neugeborenen zu beschreiben: in der BET Gruppe zeigt sich tendenziell eine Zunahme der TL im Vergleich zur Kontrollgruppe. Jedoch ist auch dieser Effekt nicht statistisch signifikant.

Einen möglichen Erklärungsansatz für den fehlenden Effekt der ANS auf die TL stellt die relativ kurzfristige Veränderung der GC Exposition während der Schwangerschaft dar. Für die regulierte Plazentapassage sorgt eine gesteigerte Expression von 11 $\beta$ HSD2. Folglich gelangt nur ein reduzierter Anteil des Betamethasons in den fetalen Kreislauf. *Braun et al.* vermuten, dass die reaktive 11 $\beta$ HSD2 Expressionsrate geschlechtsabhängig sein könnte. Sie zeigen, dass bei Jungen, v.a. bei den Frühgeborenen, nach einmaliger BET Applikation eine erhöhte Menge an 11 $\beta$ HSD2 im Plazentagewebe gemessen werden kann. Dem gegenüber induziert die gleiche Therapie bei Mädchen eine Reduktion der 11 $\beta$ HSD2 Produktion und bewirkt somit einen erhöhten transplazentaren Kortisoltransfer (36). Folglich kann man schlussfolgern, dass Mädchen eine höhere Sensibilität gegenüber der GC Exposition aufweisen als Jungen. *Bosquet Enlow et al.* postulieren, dass männliche Feten besonders sensibel auf maternale Umwelteinflüsse reagieren. Die Arbeitsgruppe untersuchte den Einfluss von potentiellen Risiko- und Schutzfaktoren in der Schwangerschaft auf die kindliche TL. Hier zeigte sich, dass u.a. ein maternaler Nikotinabusus sowie ein erhöhter BMI mit einer kürzeren TL bei Jungen assoziiert war. Protektiv scheinen ein höherer maternaler Bildungsgrad und ein hohes Maß an familiärer Unterstützung zu sein. Bei den Mädchen konnten solche Assoziationen nicht aufgezeigt werden. *Bosquet Enlow et al.* schlussfolgern, dass bereits frühzeitig der Grundstein für geschlechtsspezifische Pathogenesen von Volkskrankheiten gelegt wird (157).

Darüber hinaus stellt das Intervall zwischen der ANS und Geburt einen potentiellen Einflussfaktor der TL dar. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Aspekt zusätzlich untersucht. Das multivariate Modell in der vorliegenden Arbeit war nicht signifikant. Es bedarf weitere Studien um zu klären, ob der Zeitraum für potentielle

Programmierungseffekte der TL mit der 24. SSW bereits abgeschlossen ist, denn erst ab diesem Zeitpunkt ist die ANS zugelassen.

#### **4.3. Auswirkung der Lungenreife auf die fetalen anthropometrischen Parameter**

Unumstritten ist die Notwendigkeit der ANS bei drohender Frühgeburtlichkeit zur Reduzierung der neonatalen Morbidität und Mortalität (90). Dennoch darf nicht außer Acht gelassen werden, dass bereits ein einmaliger BET Zyklus Auswirkung auf die anthropometrischen Parameter, wie z.B. eine Reduzierung des Geburtsgewichts, der Körperlänge und des Kopfumfangs der Neugeborenen hat (46, 47, 91, 158). Mit einer Reduktion des Kopfumfangs ist u.a. ein vermindertes Hirnvolumen assoziiert (159). Für frühgeborene Kinder hat dieser Aspekt lebenslängliche Folgen. So zeigen Frühgeborene noch im Alter von sieben Jahren kognitive und motorische Beeinträchtigung im Vergleich zu gleichaltrigen Kindern, die reif geboren worden sind (160). Auch eine Reduktion des IQs (161, 162) und Lernschwierigkeiten wurden im Zusammenhang mit einem verminderten Kopfumfang (163) bei Neugeborenen beschrieben. Folglich wird in den aktuellen Empfehlungen von einer repetitiven Gabe der Lungenreife abgesehen (85).

In der vorliegenden Arbeit fiel im Rahmen der deskriptiven Analyse eine signifikante Reduktion des Kopfumfangs bei Neugeborenen, die BET exponiert waren, auf. Interessanterweise konnte der Effekt im Rahmen der Subgruppenanalyse nur bei den reifgeborenen Kindern reproduziert werden. In der Gruppe der Frühgeborenen konnte das Phänomen nicht beobachtet werden. Dies ist eventuell darin zu begründen, dass die Tokolyse, die simultan zur Lungenreife verabreicht wird, nur bis zum Abschluss der RDS-Prophylaxe vorgesehen ist, d.h. nach 48 Stunden wird die Tokolyse beendet. Kommt es im Anschluss zeitnah zur Entbindung, stehen Langzeit-Effekte auf das Schädelwachstum noch aus, da diese erst im weiteren Entwicklungsverlauf nachweisbar sind.

Für die Parameter Geburtsgewicht und Körperlänge ergaben sich in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede in den Studiengruppen. Diese Beobachtung entspricht nicht den vielfach publizierten Auswirkungen der ANS auf die anthropometrischen Parameter BET exponierter Neugeborener, sodass wir diesen Widerspruch auf die relativ kleine Studienkohorte zurückführen.

#### 4.4. Stärken und Limitationen der Studie

Bei der vorliegenden Sekundärauswertung wurden Daten einer prospektiv angelegten Fall-Kontroll-Studie verwendet. Dieses kontrollierte Design gewährleistet einen genauen Vergleich der Studiengruppen (BET- / Kontrollgruppe bzw. Früh- / Reifgeborene). Besonders hervorzuheben ist das ausgeglichene Verhältnis von gestationsalterkontrollierten Mutter-Kind-Paaren in den Beobachtungsgruppen sowie der Möglichkeit Daten von Frühgeborenen auszuwerten, deren Mütter keine Lungenreife mehr erhalten konnten. Weiterhin ist die homogene Zusammensetzung der Studienpopulation als positiv zu bewerten. Bei Betrachtung der maternalen Charakteristika fällt auf, dass es keine signifikanten Unterschiede bei den zu vergleichenden Parametern gibt. Die einzige Ausnahme bildet hier die Antibiotikagabe, die lediglich bei Betrachtung des Gesamtkollektivs in der BET Gruppe signifikant häufiger zum Einsatz kam. Zusätzlich ist die nicht-invasive Materialgewinnung der Plazentaprobe hervorzuheben. Im Rahmen der epigenetischen Analyse konnte ein Zelltyp nachgewiesen werden, sodass anhand der Beschreibung der Probengewinnung aus dem Plazentagewebe von reinem Trophoblastgewebe, entsprechend dem kindlichen Anteil der Plazenta, ausgegangen worden ist. Aufgrund des relativ reinen Gewebegrads sind die Ergebnisse der Arbeit von der Menge des Trophoblastgewebes unabhängig. Auch darf nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich bei der vorliegenden Studie um die erste Arbeit handelt, die speziell den Einfluss synthetischer GC am klinischen Beispiel der ANS auf die TL sowie veränderte Methylierungsmuster bei zentralen Genen im GC Metabolismus darstellt. Die Celestan Gabe stellt unter Berücksichtigung der Frühgeburtenrate von 8,36% im Jahr 2017 (85) in Deutschland keine Seltenheit im Alltag der Geburtsmediziner dar. Folglich ist es sehr wichtig zu erforschen, welche Auswirkungen dieser wichtige Therapieansatz ggf. langfristig auf die Neugeborenen haben kann.

Als führender limitierender Faktor kann die relativ kleine Fallzahl ( $n = 139$ ) diskutiert werden. Es handelt sich um eine Sekundäranalyse einer bereits etablierten klinischen Kohorte. In der vorliegenden Arbeit konnten mehrfach lediglich Trends, jedoch keine signifikanten Ergebnisse beschrieben werden, sodass für eine sichere Bewertung der aufgestellten Hypothesen, insbesondere hinsichtlich des geschlechtsmodulierenden Effekts, die Stichprobengröße erweitert werden sollte. Auch die Aussagekraft der Subgruppenanalysen anhand des Gestationsalters (Frühgeborene,  $n = 38$  vs.

Reifgeborene,  $n = 101$ ) ist aufgrund der geringen Fallzahlen eingeschränkt. Hierbei darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass es immer schwierig sein wird, Frauen mit Frühgeburt ohne ANS zu rekrutieren, da lediglich die unmittelbar bevorstehende Geburt, Notfallsituationen (z.B. vorzeitige Plazentalösung) oder ein fulminantes Amnioninfektionssyndrom Gründe zur Unterlassung der antenatalen BET Gabe darstellen und hierbei weitere pathologische Veränderungen in der Plazenta in Betracht gezogen werden müssten.

Limitierend ist zudem die unzureichende Darstellung sozioökonomischer Faktoren (z.B. Bildungsgrad der Mutter, Einkommen, familiäre Unterstützung) sowie fehlende Angaben bezüglich des maternalen Stresserlebens oder psychiatrische Nebendiagnosen. Im Rahmen der Daten- und Probenerfassung waren diese Informationen für die primäre Fragestellung nicht zielführend, weshalb sie für die vorliegende Sekundäranalyse nicht zur Verfügung stehen. Eine höhere Aussagekraft hätte beispielsweise mit einem eigenen Fragebogen für die werdenden Mütter erzielt werden können.

Weiterhin darf nicht außer Acht gelassen werden, dass diese Arbeit keinerlei Aussagen über potentielle Langzeiteffekte der ANS treffen kann. Insbesondere hinsichtlich der beschriebenen Methylierungsbefunde können keine Konsequenzen bei Exposition bestimmter Umweltfaktoren benannt sowie die Auswirkung der Gen-Umwelt-Interaktionen auf die gesundheitliche Entwicklung beschrieben werden. In den folgenden Studien sollte daher ein Follow-up der Neugeborenen / Kinder erfolgen um potentielle Langzeiteffekte in ihrer Entwicklung und ihrem Gesundheitsstatus beobachten zu können. Weiterhin wären Daten bezüglich möglicher Adaptationen der Methylierungsbefunde in den Kandidatengenomen oder der TL interessant über die Zeitspanne des Heranwachsens der Kinder zu erheben. Hierbei wird jedoch ein weiterer limitierender Faktor deutlich: in der vorliegenden Arbeit wurde lediglich fetales Gewebe anhand der Plazenta untersucht. Anhand der Verwendung von Material des Mutterkuchens gelang es einfach und nicht-invasiv direkten Zugang zu fetalem Gewebe zu erhalten, andererseits schließt es auch die mögliche Reproduktion / Kontrolle epigenetischer Analysen und der TL über die Lebensspanne der Kinder aus. Gleichzeitig muss kritisch hinterfragt werden, ob die Gewebespezifität ausreichend Berücksichtigung fand. Bei Verwendung von reinem Trophoblastgewebe, kann nicht sicher angenommen werden, dass die Ergebnisse in kindlichem Gewebe reproduzierbar wären.

Speziell für die NR3C1 Analysen muss festgehalten werden, dass die von *Saif et al.* (17) nachgewiesenen unterschiedlichen GR Isoformen innerhalb der Plazenta in der vorliegenden Arbeit nicht analysiert worden sind. Auch erfolgte keine weiterführende Differenzierung der genotypischen Variationen des FKBP5 Gens im vorliegenden Datensatz.

Für alle Methylierungsergebnisse gilt, dass weitere Studien benötigt werden, um das Potential einzelner hypo- oder hypermethylierter Loci in den entsprechenden Genen abschließend bewerten zu können. Weiterhin sollte in weiteren, prospektiven Studien mit größeren Studienkohorten geklärt werden, ob der Zeitpunkt der ANS einen möglichen Einflussfaktor darstellt und welche Rolle das kindliche Geschlecht hierbei spielt. Denn kann ein solcher Einfluss beschrieben werden, sollte langfristig im Sinne der perinatalen Programmierung, für die betroffenen Kinder und Heranwachsenden eine auf ihre Bedürfnisse zugeschnittene Nachsorge initiiert werden, um eine möglichst langfristige physische und psychische Gesundheitsentwicklung zu unterstützen.



## **5. Schlussfolgerung**

Die vorliegende Studie ist die erste Arbeit, die den Einfluss einer iatrogen induzierten GC Exposition am klinischen Beispiel der ANS auf die glukokortikoid-responsiven Gene NR3C1, 11 $\beta$ HSD2 und FKBP5 sowie der TL in humanem Plazentagewebe untersucht. Soweit anhand der erhobenen Daten beurteilbar, scheint die ANS zur Lungenreifeinduktion keine Auswirkungen auf das Methylierungsprofil der Gene NR3C1 und 11 $\beta$ -HSD2 zu haben. Im FKBP5 Gen konnte im Locus cg22363520 eine signifikante Hypomethylierung identifiziert werden, wobei kein Einfluss des kindlichen Geschlechts vorlag. In Studien konnte bereits gezeigt werden, dass unter Berücksichtigung der Lokalisation der betroffenen CpGs sowie der Allelausstattung des FKBP5 Gens Hypomethylierungen mit einer negativen FKBP5 Expression korrelieren. So kann anhand des vorliegenden Ergebnisses diskutiert werden, dass aufgrund der reduzierten GR Sensitivität langfristig Programmierungseffekte bestehen, Kinder nach ANS sensibler auf Stress reagieren und somit eine erhöhte Vulnerabilität für die Entwicklung stressassoziierter psychischer Erkrankungen unter Berücksichtigung der Gen-Umwelt-Interaktion haben könnten.

Hinsichtlich der TL konnte aufgezeigt werden, dass sich nach ANS die TL zwischen den Geschlechtern tendenziell angleicht. So konnte bei den Jungen eine Zunahme der TL bzw. bei den Mädchen eine leichte Reduktion beschrieben werden. Auch für den Einfluss der ANS auf die TL bedarf es weitere prospektiv angelegte Longitudinalstudien mit größeren Studienkohorten, die die vorliegenden Ergebnisse kontrollieren, sodass in der Konsequenz ggf. eine Anpassung des Vorgehens bei drohender Frühgeburt in Abhängigkeit vom fetalen Geschlecht notwendig wird.

Mit Blick auf die Gegenwart und die Zukunft ist festzuhalten, dass die ANS die wichtigste Therapieoption in der Reduktion von Morbidität und Mortalität der Frühgeborenen darstellt. Die Lungenreife scheint primär kurzfristige Veränderungen im GC Metabolismus hervorzurufen. Dennoch konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit in einzelnen Loci der Kandidatengene Veränderungen im Methylierungsprofil nachgewiesen werden. Deren jeweilige Langzeiteffekte müssen in weiteren Longitudinalstudien mit größeren Fallzahlen weiter erforscht werden. Erst wenn die genauen Ursachen und Programmierungseffekte der Anpassungen im Methylierungsmuster einzelner Gene erforscht ist, können Präventionsprogramme für

Kinder und später Erwachsene nach ANS erstellt werden, um ihnen eine langfristige Gesundheit zu ermöglichen. Hierbei sollte das fetale Geschlecht in Zukunft Berücksichtigung finden, da für weibliche Feten eventuell ein anderes Therapieregime greifen muss, als für ihre männlichen Altersgenossen.

## **6. Literaturverzeichnis**

1. Gluckman PD, Hanson MA. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science (New York, NY)*. 2004;305(5691):1733-6.
2. Entringer S, Buss C, Heim C. Frühe Stresserfahrungen und Krankheitsvulnerabilität. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*. 2016;59(10):1255-61.
3. Dorner G. Problems and terminology of functional teratology. *Acta Biol Med Ger*. 1975;34(6):1093-5.
4. Dörner G. Hormone-dependent brain development. *Psychoneuroendocrinology*. 1983;8(2):205-12.
5. Barker DJ, Osmond C, Simmonds SJ, Wield GA. The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life. *BMJ (Clinical research ed)*. 1993;306(6875):422-6.
6. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. 1992. *International journal of epidemiology*. 2013;42(5):1215-22.
7. BOO HAD, HARDING JE. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2006;46(1):4-14.
8. Matthews SG, McGowan PO. Developmental programming of the HPA axis and related behaviours: epigenetic mechanisms. 2019;242(1):T69.
9. Oyola MG, Handa RJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress*. 2017;20(5):476-94.
10. Duthie L, Reynolds RM. Changes in the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis in pregnancy and postpartum: influences on maternal and fetal outcomes. *Neuroendocrinology*. 2013;98(2):106-15.
11. Braun T. Antenatale Glukokortikoid-Therapie, fetale Programmierung und die Rolle der Plazenta / vorgelegt von Thorsten Braun. Berlin: Berlin; 2017.
12. Oberlander TF, Weinberg J, Papsdorf M, Grunau R, Misri S, Devlin AM. Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses. *Epigenetics*. 2008;3(2):97-106.
13. Püschel GM, Kühn HM, Kietzmann TM, Höhne WM, Christ BM, Doenecke DM, Koolman JM. Taschenlehrbuch Biochemie. Stuttgart: Thieme; 2011.
14. Cuffe JSM, Saif Z, Perkins AV, Moritz KM, Clifton VL. Dexamethasone and sex regulate placental glucocorticoid receptor isoforms in mice. *The Journal of endocrinology*. 2017;234(2):89-100.
15. Saif Z, Dyson RM, Palliser HK, Wright IM, Lu N, Clifton VL. Identification of Eight Different Isoforms of the Glucocorticoid Receptor in Guinea Pig Placenta: Relationship to Preterm Delivery, Sex and Betamethasone Exposure. *PloS one*. 2016;11(2):e0148226.
16. Clifton VL, McDonald M, Morrison JL, Holman SL, Lock MC, Saif Z, Meakin A, Wooldridge AL, Gatford KL, Wallace MJ, Muhlhausler BS, Bischof RJ, Moss TJM. Placental glucocorticoid receptor isoforms in a sheep model of maternal allergic asthma. *Placenta*. 2019;83:33-6.
17. Saif Z, Hodyl NA, Hobbs E, Tuck AR, Butler MS, Osei-Kumah A, Clifton VL. The human placenta expresses multiple glucocorticoid receptor isoforms that are altered by fetal sex, growth restriction and maternal asthma. *Placenta*. 2014;35(4):260-8.

18. Criado-Marrero M, Rein T, Binder EB, Porter JT, Koren J, 3rd, Blair LJ. Hsp90 and FKBP51: complex regulators of psychiatric diseases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2018;373(1738).
19. Zannas AS, Wiechmann T, Gassen NC, Binder EB. Gene-Stress-Epigenetic Regulation of FKBP5: Clinical and Translational Implications. *Neuropsychopharmacology.* 2016;41(1):261-74.
20. Zannas AS, Binder EB. Gene-environment interactions at the FKBP5 locus: sensitive periods, mechanisms and pleiotropism. *Genes, brain, and behavior.* 2014;13(1):25-37.
21. Russell GM, Henley DE, Leendertz J, Douthwaite JA, Wood SA, Stevens A, Woltersdorf WW, Peeters BW, Ruyt GS, White A, Veldhuis JD, Lightman SL. Rapid glucocorticoid receptor-mediated inhibition of hypothalamic-pituitary-adrenal ultradian activity in healthy males. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2010;30(17):6106-15.
22. Watts AG. Glucocorticoid regulation of peptide genes in neuroendocrine CRH neurons: a complexity beyond negative feedback. *Front Neuroendocrinol.* 2005;26(3-4):109-30.
23. Gassen NC, Chrousos GP, Binder EB, Zannas AS. Life stress, glucocorticoid signaling, and the aging epigenome: Implications for aging-related diseases. *Neuroscience and biobehavioral reviews.* 2017;74(Pt B):356-65.
24. Wochnik GM, Rüegg J, Abel GA, Schmidt U, Holsboer F, Rein T. FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2005;280(6):4609-16.
25. Costa A, Rocci MP, Arisio R, Benedetto C, Fabris C, Bertino E, Botta G, Marozio L, Mostert M, Urbano D, Emanuel A. Glucocorticoid receptors immunoreactivity in tissue of human embryos. *J Endocrinol Invest.* 1996;19(2):92-8.
26. Harris A, Seckl J. Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Hormones and behavior.* 2011;59(3):279-89.
27. Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Kriegstein K, Schmid W, Aguzzi A, Fantuzzi G, Hummler E, Unsicker K, Schutz G. Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes & development.* 1995;9(13):1608-21.
28. Goland RS, Tropper PJ, Warren WB, Stark RI, Jozak SM, Conwell IM. Concentrations of corticotrophin-releasing hormone in the umbilical-cord blood of pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Reprod Fertil Dev.* 1995;7(5):1227-30.
29. Seckl JR, Holmes MC. Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal 'programming' of adult pathophysiology. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2007;3(6):479-88.
30. Beitins IZ, Bayard F, Ances IG, Kowarski A, Migeon CJ. The metabolic clearance rate, blood production, interconversion and transplacental passage of cortisol and cortisone in pregnancy near term. *Pediatric research.* 1973;7(5):509-19.
31. Seckl JR. Glucocorticoids, feto-placental 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, and the early life origins of adult disease. *Steroids.* 1997;62(1):89-94.
32. Benediktsson R, Calder AA, Edwards CR, Seckl JR. Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a key regulator of fetal glucocorticoid exposure. *Clinical endocrinology.* 1997;46(2):161-6.
33. Ghaemmaghami P, Dainese SM, La Marca R, Zimmermann R, Ehlert U. The association between the acute psychobiological stress response in second

- trimester pregnant women, amniotic fluid glucocorticoids, and neonatal birth outcome. *Developmental psychobiology*. 2014;56(4):734-47.
34. Welberg LA, Thrivikraman KV, Plotsky PM. Chronic maternal stress inhibits the capacity to up-regulate placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity. *The Journal of endocrinology*. 2005;186(3):R7-r12.
  35. Edwards CR, Benediktsson R, Lindsay RS, Seckl JR. Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult hypertension? *Lancet (London, England)*. 1993;341(8841):355-7.
  36. Braun F, Hardt AK, Ehrlich L, Sloboda DM, Challis JRG, Plagemann A, Henrich W, Braun T. Sex-specific and lasting effects of a single course of antenatal betamethasone treatment on human placental 11beta-HSD2. *Placenta*. 2018;69:9-19.
  37. Seckl JR. Physiologic programming of the fetus. *Clinics in perinatology*. 1998;25(4):939-62, vii.
  38. Stewart PM, Rogerson FM, Mason JI. Type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase messenger ribonucleic acid and activity in human placenta and fetal membranes: its relationship to birth weight and putative role in fetal adrenal steroidogenesis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1995;80(3):885-90.
  39. McTernan CL, Draper N, Nicholson H, Chalder SM, Driver P, Hewison M, Kilby MD, Stewart PM. Reduced placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 mRNA levels in human pregnancies complicated by intrauterine growth restriction: an analysis of possible mechanisms. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001;86(10):4979-83.
  40. Brown RW, Diaz R, Robson AC, Kotelevtsev YV, Mullins JJ, Kaufman MH, Seckl JR. The ontogeny of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor gene expression reveal intricate control of glucocorticoid action in development. *Endocrinology*. 1996;137(2):794-7.
  41. Holmes MC, Abrahamsen CT, French KL, Paterson JM, Mullins JJ, Seckl JR. The mother or the fetus? 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 null mice provide evidence for direct fetal programming of behavior by endogenous glucocorticoids. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(14):3840-4.
  42. Ikegami M, Jobe AH, Newnham J, Polk DH, Willet KE, Sly P. Repetitive prenatal glucocorticoids improve lung function and decrease growth in preterm lambs. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997;156(1):178-84.
  43. Jobe AH, Wada N, Berry LM, Ikegami M, Ervin MG. Single and repetitive maternal glucocorticoid exposures reduce fetal growth in sheep. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1998;178(5):880-5.
  44. Norberg H, Stalnacke J, Diaz Heijtz R, Smedler AC, Nyman M, Forssberg H, Norman M. Antenatal corticosteroids for preterm birth: dose-dependent reduction in birthweight, length and head circumference. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*. 2011;100(3):364-9.
  45. Bloom SL, Sheffield JS, McIntire DD, Leveno KJ. Antenatal dexamethasone and decreased birth weight. *Obstetrics and gynecology*. 2001;97(4):485-90.
  46. French NP, Hagan R, Evans SF, Godfrey M, Newnham JP. Repeated antenatal corticosteroids: size at birth and subsequent development. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1999;180(1 Pt 1):114-21.
  47. Braun T, Sloboda DM, Tutschek B, Harder T, Challis JR, Dudenhausen JW, Plagemann A, Henrich W. Fetal and neonatal outcomes after term and preterm

- delivery following betamethasone administration. *Int J Gynaecol Obstet*. 2015;130(1):64-9.
48. Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *The New England journal of medicine*. 2008;359(1):61-73.
  49. Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet (London, England)*. 1986;1(8489):1077-81.
  50. Osmond C, Barker DJ, Winter PD, Fall CH, Simmonds SJ. Early growth and death from cardiovascular disease in women. *BMJ (Clinical research ed)*. 1993;307(6918):1519-24.
  51. Kensara OA, Wootton SA, Phillips DI, Patel M, Jackson AA, Elia M. Fetal programming of body composition: relation between birth weight and body composition measured with dual-energy X-ray absorptiometry and anthropometric methods in older Englishmen. *The American journal of clinical nutrition*. 2005;82(5):980-7.
  52. Warrington NM, Beaumont RN, Horikoshi M, Day FR, Helgeland Ø, Laurin C, Bacelis J, Peng S, Hao K, Feenstra B, Wood AR, Mahajan A, Tyrrell J, Robertson NR, Rayner NW, Qiao Z, Moen GH, Vaudel M, Marsit CJ, Chen J, Nodzenski M, Schnurr TM, Zafarmand MH, Bradfield JP, Grarup N, Kooijman MN, Li-Gao R, Geller F, Ahluwalia TS, Paternoster L, Rueedi R, Huikari V, Hottenga JJ, Lyytikäinen LP, Cavadino A, Metrustry S, Cousminer DL, Wu Y, Thiering E, Wang CA, Have CT, Vilor-Tejedor N, Joshi PK, Painter JN, Ntalla I, Myhre R, Pitkänen N, van Leeuwen EM, Joro R, Lagou V, Richmond RC, Espinosa A, Barton SJ, Inskip HM, Holloway JW, Santa-Marina L, Estivill X, Ang W, Marsh JA, Reichetzeder C, Marullo L, Hocher B, Lunetta KL, Murabito JM, Relton CL, Kogevinas M, Chatzi L, Allard C, Bouchard L, Hivert MF, Zhang G, Muglia LJ, Heikkinen J, Morgen CS, van Kampen AHC, van Schaik BDC, Mentch FD, Langenberg C, Luan J, Scott RA, Zhao JH, Hemani G, Ring SM, Bennett AJ, Gaulton KJ, Fernandez-Tajes J, van Zuydam NR, Medina-Gomez C, de Haan HG, Rosendaal FR, Kutalik Z, Marques-Vidal P, Das S, Willemsen G, Mbarek H, Müller-Nurasyid M, Standl M, Appel EVR, Fonvig CE, Trier C, van Beijsterveldt CEM, Murcia M, Bustamante M, Bonas-Guarch S, Hougaard DM, Mercader JM, Linneberg A, Schraut KE, Lind PA, Medland SE, Shields BM, Knight BA, Chai JF, Panoutsopoulou K, Bartels M, Sánchez F, Stockholm J, Torrents D, Vinding RK, Willems SM, Atalay M, Chawes BL, Kovacs P, Prokopenko I, Tuke MA, Yaghootkar H, Ruth KS, Jones SE, Loh PR, Murray A, Weedon MN, Tönjes A, Stumvoll M, Michaelsen KF, Eloranta AM, Lakka TA, van Duijn CM, Kiess W, Körner A, Niinikoski H, Pakkala K, Raitakari OT, Jacobsson B, Zeggini E, Dedoussis GV, Teo YY, Saw SM, Montgomery GW, Campbell H, Wilson JF, Vrijkkotte TGM, Vrijheid M, de Geus E, Hayes MG, Kadarmideen HN, Holm JC, Beilin LJ, Pennell CE, Heinrich J, Adair LS, Borja JB, Mohlke KL, Eriksson JG, Widén EE, Hattersley AT, Spector TD, Kähönen M, Viikari JS, Lehtimäki T, Boomsma DI, Sebert S, Vollenweider P, Sørensen TIA, Bisgaard H, Bønnelykke K, Murray JC, Melbye M, Nohr EA, Mook-Kanamori DO, Rivadeneira F, Hofman A, Felix JF, Jaddoe VVW, Hansen T, Pisinger C, Vaag AA, Pedersen O, Uitterlinden AG, Järvelin MR, Power C, Hyppönen E, Scholtens DM, Lowe WL, Jr., Davey Smith G, Timpson NJ, Morris AP, Wareham NJ, Hakonarson H, Grant SFA, Frayling TM, Lawlor DA, Njølstad PR, Johansson S, Ong KK, McCarthy MI, Perry JRB, Evans DM, Freathy RM.

- Maternal and fetal genetic effects on birth weight and their relevance to cardio-metabolic risk factors. *Nature genetics*. 2019;51(5):804-14.
53. Berry LM, Polk DH, Ikegami M, Jobe AH, Padbury JF, Ervin MG. Preterm newborn lamb renal and cardiovascular responses after fetal or maternal antenatal betamethasone. *The American journal of physiology*. 1997;272(6 Pt 2):R1972-9.
  54. Tangalakis K, Lumbers ER, Moritz KM, Towstoles MK, Wintour EM. Effect of cortisol on blood pressure and vascular reactivity in the ovine fetus. *Experimental physiology*. 1992;77(5):709-17.
  55. de Vries A, Holmes MC, Heijnis A, Seier JV, Heerden J, Louw J, Wolfe-Coote S, Meaney MJ, Levitt NS, Seckl JR. Prenatal dexamethasone exposure induces changes in nonhuman primate offspring cardiometabolic and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(4):1058-67.
  56. Koenen SV, Mecnas CA, Smith GS, Jenkins S, Nathanielsz PW. Effects of maternal betamethasone administration on fetal and maternal blood pressure and heart rate in the baboon at 0.7 of gestation. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2002;186(4):812-7.
  57. Benediktsson R, Lindsay RS, Noble J, Seckl JR, Edwards CR. Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *Lancet (London, England)*. 1993;341(8841):339-41.
  58. Khulan B, Drake AJ. Glucocorticoids as mediators of developmental programming effects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2012;26(5):689-700.
  59. O'Regan D, Kenyon CJ, Seckl JR, Holmes MC. Glucocorticoid exposure in late gestation in the rat permanently programs gender-specific differences in adult cardiovascular and metabolic physiology. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2004;287(5):E863-70.
  60. Zimmermann H, Gardner DS, Jellyman JK, Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ. Effect of dexamethasone on pulmonary and renal angiotensin-converting enzyme concentration in fetal sheep during late gestation. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2003;189(5):1467-71.
  61. Doyle LW, Ford GW, Davis NM, Callanan C. Antenatal corticosteroid therapy and blood pressure at 14 years of age in preterm children. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2000;98(2):137-42.
  62. Huh SY, Andrew R, Rich-Edwards JW, Kleinman KP, Seckl JR, Gillman MW. Association between umbilical cord glucocorticoids and blood pressure at age 3 years. *BMC medicine*. 2008;6:25.
  63. Stinson LJ, Stroud LR, Buka SL, Eaton CB, Lu B, Niaura R, Loucks EB. Prospective evaluation of associations between prenatal cortisol and adulthood coronary heart disease risk: the New England family study. *Psychosomatic medicine*. 2015;77(3):237-45.
  64. Reynolds RM. Impact of maternal steroids during pregnancy. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2016;77(6):677-9.
  65. Nyirenda MJ, Lindsay RS, Kenyon CJ, Burchell A, Seckl JR. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(10):2174-81.
  66. Lindsay RS, Lindsay RM, Waddell BJ, Seckl JR. Prenatal glucocorticoid exposure leads to offspring hyperglycaemia in the rat: studies with the 11 beta-

- hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone. *Diabetologia*. 1996;39(11):1299-305.
67. Lesage J, Del-Favero F, Leonhardt M, Louvart H, Maccari S, Vieau D, Darnaudey M. Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behaviour disturbances in the aged rat. *The Journal of endocrinology*. 2004;181(2):291-6.
  68. Sloboda DM, Newnham JP, Challis JR. Repeated maternal glucocorticoid administration and the developing liver in fetal sheep. *The Journal of endocrinology*. 2002;175(2):535-43.
  69. Blondeau B, Lesage J, Czernichow P, Dupouy JP, Breant B. Glucocorticoids impair fetal beta-cell development in rats. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2001;281(3):E592-9.
  70. Dalziel SR, Walker NK, Parag V, Mantell C, Rea HH, Rodgers A, Harding JE. Cardiovascular risk factors after antenatal exposure to betamethasone: 30-year follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*. 2005;365(9474):1856-62.
  71. Entringer S, Wüst S, Kumsta R, Layes IM, Nelson EL, Hellhammer DH, Wadhwa PD. Prenatal psychosocial stress exposure is associated with insulin resistance in young adults. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2008;199(5):498.e1-.e7.
  72. Entringer S, Buss C, Rasmussen JM, Lindsay K, Gillen DL, Cooper DM, Wadhwa PD. Maternal Cortisol During Pregnancy and Infant Adiposity: A Prospective Investigation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2017;102(4):1366-74.
  73. Koontz MB, Gunzler DD, Presley L, Catalano PM. Longitudinal changes in infant body composition: association with childhood obesity. *Pediatric obesity*. 2014;9(6):e141-4.
  74. Druet C, Stettler N, Sharp S, Simmons RK, Cooper C, Smith GD, Ekelund U, Levy-Marchal C, Jarvelin MR, Kuh D, Ong KK. Prediction of childhood obesity by infancy weight gain: an individual-level meta-analysis. *Paediatric and perinatal epidemiology*. 2012;26(1):19-26.
  75. Entringer S, Buss C, Kumsta R, Hellhammer DH, Wadhwa PD, Wust S. Prenatal psychosocial stress exposure is associated with subsequent working memory performance in young women. *Behavioral neuroscience*. 2009;123(4):886-93.
  76. LeWinn KZ, Stroud LR, Molnar BE, Ware JH, Koenen KC, Buka SL. Elevated maternal cortisol levels during pregnancy are associated with reduced childhood IQ. *International journal of epidemiology*. 2009;38(6):1700-10.
  77. Laplante DP, Brunet A, Schmitz N, Ciampi A, King S. Project Ice Storm: prenatal maternal stress affects cognitive and linguistic functioning in 5 1/2-year-old children. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 2008;47(9):1063-72.
  78. Welberg LA, Seckl JR, Holmes MC. Prenatal glucocorticoid programming of brain corticosteroid receptors and corticotrophin-releasing hormone: possible implications for behaviour. *Neuroscience*. 2001;104(1):71-9.
  79. Mandyam CD, Crawford EF, Eisch AJ, Rivier CL, Richardson HN. Stress experienced in utero reduces sexual dichotomies in neurogenesis, microenvironment, and cell death in the adult rat hippocampus. *Developmental neurobiology*. 2008;68(5):575-89.
  80. Pryce CR, Aubert Y, Maier C, Pearce PC, Fuchs E. The developmental impact of prenatal stress, prenatal dexamethasone and postnatal social stress on



- physiology, behaviour and neuroanatomy of primate offspring: studies in rhesus macaque and common marmoset. *Psychopharmacology*. 2011;214(1):33-53.
81. Buss C, Davis EP, Muftuler LT, Head K, Sandman CA. High pregnancy anxiety during mid-gestation is associated with decreased gray matter density in 6-9-year-old children. *Psychoneuroendocrinology*. 2010;35(1):141-53.
  82. Buss C, Davis EP, Shahbaba B, Pruessner JC, Head K, Sandman CA. Maternal cortisol over the course of pregnancy and subsequent child amygdala and hippocampus volumes and affective problems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(20):E1312-9.
  83. Glover V. Annual Research Review: Prenatal stress and the origins of psychopathology: an evolutionary perspective. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*. 2011;52(4):356-67.
  84. Räikkönen K, Gissler M, Kajantie E. Associations Between Maternal Antenatal Corticosteroid Treatment and Mental and Behavioral Disorders in Children. *Jama*. 2020;323(19):1924-33.
  85. Prevention and therapy of preterm labour. Guideline of the DGGG, OEGGG and SGGG (S2k-Level, AWMF Registry No.015/025, February 2019) [Internet]. 2019 [cited 3 December 2020]. Available from: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/015-025l\\_S2k\\_Praevention-  
Therapie\\_Fruehgeburt\\_2020-02.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/015-025l_S2k_Praevention-<br/>Therapie_Fruehgeburt_2020-02.pdf)
  86. Christoph Bühner (Berlin G, Ursula Felderhoff-Müser (Essen, GNPI), Ulrich Gembruch (Bonn, DGGG), Kurt Hecher (Hamburg, DGGG), Franz Kainer (Nürnberg, DGGG), Sven Kehl (Erlangen, DGPM), André Kieszun (Mainz, AEM), Angela Kribs (Köln, GNPI), Tanja Krones (Zürich, AEM), Volker Lipp (Göttingen, GNPI), Rolf F. Maier (Marburg, DGKJ/DGPM), Barbara Mitschdörfer (Frankfurt, BVFK), Tatjana Nicin (Hanau, DHV), Claudia Roll (Datteln, GNPI),, Monika Schindler (Mannheim B. Frühgeborene an der Grenze der Lebensfähigkeit [Internet]. 2020 [cited 3 December 2020]. Available from: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/024-  
019l\\_S2k\\_Fruehgeburt\\_Grenze\\_Lebensfaehigkeit\\_2020-06.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/024-<br/>019l_S2k_Fruehgeburt_Grenze_Lebensfaehigkeit_2020-06.pdf) 2020 [
  87. Liggins GC, Howie RN. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics*. 1972;50(4):515-25.
  88. Blanford AT, Murphy BE. In vitro metabolism of prednisolone, dexamethasone, betamethasone, and cortisol by the human placenta. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1977;127(3):264-7.
  89. Ballard PL, Ballard RA. Scientific basis and therapeutic regimens for use of antenatal glucocorticoids. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1995;173(1):254-62.
  90. Roberts D, Brown J, Medley N, Dalziel SR. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2017;3:Cd004454.
  91. Braun T, Husar A, Challis JR, Dudenhausen JW, Henrich W, Plagemann A, Sloboda DM. Growth restricting effects of a single course of antenatal betamethasone treatment and the role of human placental lactogen. *Placenta*. 2013;34(5):407-15.
  92. Ostlund BD, Conradt E, Crowell SE, Tyrka AR, Marsit CJ, Lester BM. Prenatal Stress, Fearfulness, and the Epigenome: Exploratory Analysis of Sex Differences in DNA Methylation of the Glucocorticoid Receptor Gene. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2016;10:147.

93. Telese F, Gamliel A, Skowronska-Krawczyk D, Garcia-Bassets I, Rosenfeld MG. "Seq-ing" insights into the epigenetics of neuronal gene regulation. *Neuron*. 2013;77(4):606-23.
94. Wiench M, John S, Baek S, Johnson TA, Sung MH, Escobar T, Simmons CA, Pearce KH, Biddie SC, Sabo PJ, Thurman RE, Stamatoyannopoulos JA, Hager GL. DNA methylation status predicts cell type-specific enhancer activity. *The EMBO journal*. 2011;30(15):3028-39.
95. Thomassin H, Flavin M, Espinas ML, Grange T. Glucocorticoid-induced DNA demethylation and gene memory during development. *The EMBO journal*. 2001;20(8):1974-83.
96. Yang X, Ewald ER, Huo Y, Tamashiro KL, Salvatori R, Sawa A, Wand GS, Lee RS. Glucocorticoid-induced loss of DNA methylation in non-neuronal cells and potential involvement of DNMT1 in epigenetic regulation of Fkbp5. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;420(3):570-5.
97. Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature neuroscience*. 2004;7(8):847-54.
98. McGowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC, Dymov S, Labonte B, Szyf M, Turecki G, Meaney MJ. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nature neuroscience*. 2009;12(3):342-8.
99. Denny WB, Valentine DL, Reynolds PD, Smith DF, Scammell JG. Squirrel monkey immunophilin FKBP51 is a potent inhibitor of glucocorticoid receptor binding. *Endocrinology*. 2000;141(11):4107-13.
100. Binder EB. The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34 Suppl 1:S186-95.
101. Binder EB, Salyakina D, Lichtner P, Wochnik GM, Ising M, Putz B, Papiol S, Seaman S, Lucae S, Kohli MA, Nickel T, Kunzel HE, Fuchs B, Majer M, Pfennig A, Kern N, Brunner J, Modell S, Baghai T, Deiml T, Zill P, Bondy B, Rupprecht R, Messer T, Kohnlein O, Dabitz H, Bruckl T, Muller N, Pfister H, Lieb R, Mueller JC, Lohmussaar E, Strom TM, Bettecken T, Meitinger T, Uhr M, Rein T, Holsboer F, Muller-Myhsok B. Polymorphisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment. *Nature genetics*. 2004;36(12):1319-25.
102. Binder EB, Bradley RG, Liu W, Epstein MP, Deveau TC, Mercer KB, Tang Y, Gillespie CF, Heim CM, Nemeroff CB, Schwartz AC, Cubells JF, Ressler KJ. Association of FKBP5 polymorphisms and childhood abuse with risk of posttraumatic stress disorder symptoms in adults. *Jama*. 2008;299(11):1291-305.
103. Gassen NC, Fries GR, Zannas AS, Hartmann J, Zschocke J, Hafner K, Carrillo-Roa T, Steinbacher J, Preissinger SN, Hoeijmakers L, Knop M, Weber F, Kloiber S, Lucae S, Chrousos GP, Carell T, Ising M, Binder EB, Schmidt MV, Ruegg J, Rein T. Chaperoning epigenetics: FKBP51 decreases the activity of DNMT1 and mediates epigenetic effects of the antidepressant paroxetine. *Science signaling*. 2015;8(404):ra119.
104. Entringer S, de Punder K, Buss C, Wadhwa PD. The fetal programming of telomere biology hypothesis: an update. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2018;373(1741).
105. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>,

- present at the telomeres of human chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(18):6622-6.
106. van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell*. 1998;92(3):401-13.
  107. Wright WE, Tesmer VM, Huffman KE, Levene SD, Shay JW. Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes & development*. 1997;11(21):2801-9.
  108. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*. 1999;97(4):503-14.
  109. de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & development*. 2005;19(18):2100-10.
  110. Palm W, de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annual review of genetics*. 2008;42:301-34.
  111. de Lange T. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene*. 2002;21(4):532-40.
  112. Bosquet Enlow M, Sideridis G, Bollati V, Hoxha M, Hacker MR, Wright RJ. Maternal cortisol output in pregnancy and newborn telomere length: Evidence for sex-specific effects. *Psychoneuroendocrinology*. 2019;102:225-35.
  113. Schaaf CP. *Basiswissen Humangenetik von Christian P. Schaaf, Johannes Zschocke*. 2nd ed. ed. Zschocke J, editor. Berlin, Heidelberg: Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg : Imprint: Springer; 2013. 1 online resource (376 p.) p.
  114. Frencck RW, Jr., Blackburn EH, Shannon KM. The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(10):5607-10.
  115. Greider CW. Telomeres, telomerase and senescence. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 1990;12(8):363-9.
  116. Shay JW, Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2000;1(1):72-6.
  117. Cong YS, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2002;66(3):407-25, table of contents.
  118. Greider CW, Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*. 1989;337(6205):331-7.
  119. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Developmental genetics*. 1996;18(2):173-9.
  120. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science (New York, NY)*. 1994;266(5193):2011-5.
  121. Flores I, Benetti R, Blasco MA. Telomerase regulation and stem cell behaviour. *Current opinion in cell biology*. 2006;18(3):254-60.
  122. Tsamou M, Martens DS, Cox B, Madhloum N, Vrijens K, Nawrot TS. Sex-specific associations between telomere length and candidate miRNA expression in placenta. *J Transl Med*. 2018;16(1):254.
  123. Blackburn EH, Epel ES, Lin J. Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science (New York, NY)*. 2015;350(6265):1193-8.

124. Entringer S, Epel ES, Kumsta R, Lin J, Hellhammer DH, Blackburn EH, Wust S, Wadhwa PD. Stress exposure in intrauterine life is associated with shorter telomere length in young adulthood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(33):E513-8.
125. Price LH, Kao HT, Burgers DE, Carpenter LL, Tyrka AR. Telomeres and early-life stress: an overview. *Biological psychiatry*. 2013;73(1):15-23.
126. Choi J, Fauce SR, Effros RB. Reduced telomerase activity in human T lymphocytes exposed to cortisol. *Brain, behavior, and immunity*. 2008;22(4):600-5.
127. de Punder K, Heim C, Przesdzing I, Wadhwa PD, Entringer S. Characterization in humans of in vitro leucocyte maximal telomerase activity capacity and association with stress. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2018;373(1741).
128. Blasco MA. The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nat Rev Genet*. 2007;8(4):299-309.
129. Davis EP, Sandman CA, Buss C, Wing DA, Head K. Fetal glucocorticoid exposure is associated with preadolescent brain development. *Biological psychiatry*. 2013;74(9):647-55.
130. Doyle C, Werner E, Feng T, Lee S, Altemus M, Isler JR, Monk C. Pregnancy distress gets under fetal skin: Maternal ambulatory assessment & sex differences in prenatal development. *Developmental psychobiology*. 2015;57(5):607-25.
131. Van den Bergh BRH, van den Heuvel MI, Lahti M, Braeken M, de Rooij SR, Entringer S, Hoyer D, Roseboom T, Raikkonen K, King S, Schwab M. Prenatal developmental origins of behavior and mental health: The influence of maternal stress in pregnancy. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2017.
132. DiPietro JA, Costigan KA, Kivlighan KT, Chen P, Laudenslager ML. Maternal salivary cortisol differs by fetal sex during the second half of pregnancy. *Psychoneuroendocrinology*. 2011;36(4):588-91.
133. Benetos A, Kark JD, Susser E, Kimura M, Sinnreich R, Chen W, Steenstrup T, Christensen K, Herbig U, von Bornemann Hjelmberg J, Srinivasan SR, Berenson GS, Labat C, Aviv A. Tracking and fixed ranking of leukocyte telomere length across the adult life course. *Aging cell*. 2013;12(4):615-21.
134. Martens DS, Plusquin M, Gyselaers W, De Vivo I, Nawrot TS. Maternal pre-pregnancy body mass index and newborn telomere length. *BMC medicine*. 2016;14(1):148.
135. Entringer S, Buss C, Wadhwa PD. Prenatal stress, development, health and disease risk: A psychobiological perspective-2015 Curt Richter Award Paper. *Psychoneuroendocrinology*. 2015;62:366-75.
136. Gil HC. Auswirkungen antenataler Betamethason-Applikation zur Induktion der fetalen Lungenreife bei Zwillingschwangerschaften 2014.
137. Avagliano L, Locatelli A, Danti L, Felis S, Mecacci F, Bulfamante GP. Placental histology in clinically unexpected severe fetal acidemia at term. *Early Hum Dev*. 2015;91(5):339-43.
138. Martens DS, Janssen BG, Bijmens EM, Clemente DBP, Vineis P, Plusquin M, Nawrot TS. Association of Parental Socioeconomic Status and Newborn Telomere Length. *JAMA Netw Open*. 2020;3(5):e204057.
139. Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, Delano D, Zhang L, Schroth GP, Gunderson KL, Fan JB, Shen R. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*. 2011;98(4):288-95.

140. Du P, Zhang X, Huang CC, Jafari N, Kibbe WA, Hou L, Lin SM. Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. *BMC Bioinformatics*. 2010;11:587.
141. Maksimovic J, Gordon L, Oshlack A. SWAN: Subset-quantile within array normalization for illumina infinium HumanMethylation450 BeadChips. *Genome biology*. 2012;13(6):R44.
142. Houseman EA, Molitor J, Marsit CJ. Reference-free cell mixture adjustments in analysis of DNA methylation data. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2014;30(10):1431-9.
143. Green GH, Diggle PJ. On the operational characteristics of the Benjamini and Hochberg False Discovery Rate procedure. *Statistical applications in genetics and molecular biology*. 2007;6:Article27.
144. Lazarides C, Epel ES, Lin J, Blackburn EH, Voelkle MC, Buss C, Simhan HN, Wadhwa PD, Entringer S. Maternal pro-inflammatory state during pregnancy and newborn leukocyte telomere length: A prospective investigation. *Brain, behavior, and immunity*. 2019;80:419-26.
145. Conradt E, Lester BM, Appleton AA, Armstrong DA, Marsit CJ. The roles of DNA methylation of NR3C1 and 11beta-HSD2 and exposure to maternal mood disorder in utero on newborn neurobehavior. *Epigenetics*. 2013;8(12):1321-9.
146. Reynolds RM, Pesonen AK, O'Reilly JR, Tuovinen S, Lahti M, Kajantie E, Villa PM, Laivuori H, Hamalainen E, Seckl JR, Raikkonen K. Maternal depressive symptoms throughout pregnancy are associated with increased placental glucocorticoid sensitivity. *Psychological medicine*. 2015;45(10):2023-30.
147. Mueller BR, Bale TL. Sex-specific programming of offspring emotionality after stress early in pregnancy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2008;28(36):9055-65.
148. Monk C, Feng T, Lee S, Krupka I, Champagne FA, Tycko B. Distress During Pregnancy: Epigenetic Regulation of Placenta Glucocorticoid-Related Genes and Fetal Neurobehavior. *The American journal of psychiatry*. 2016;173(7):705-13.
149. Liu PZ, Nusslock R. How Stress Gets Under the Skin: Early Life Adversity and Glucocorticoid Receptor Epigenetic Regulation. *Current genomics*. 2018;19(8):653-64.
150. Jensen Pena C, Monk C, Champagne FA. Epigenetic effects of prenatal stress on 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-2 in the placenta and fetal brain. *PloS one*. 2012;7(6):e39791.
151. Paquette AG, Lester BM, Lesseur C, Armstrong DA, Guerin DJ, Appleton AA, Marsit CJ. Placental epigenetic patterning of glucocorticoid response genes is associated with infant neurodevelopment. *Epigenomics*. 2015;7(5):767-79.
152. Ising M, Maccarrone G, Bruckl T, Scheuer S, Hennings J, Holsboer F, Turck CW, Uhr M, Lucae S. FKBP5 Gene Expression Predicts Antidepressant Treatment Outcome in Depression. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3).
153. Paquette AG, Lester BM, Koestler DC, Lesseur C, Armstrong DA, Marsit CJ. Placental FKBP5 genetic and epigenetic variation is associated with infant neurobehavioral outcomes in the RICHS cohort. *PloS one*. 2014;9(8):e104913.
154. Klengel T, Mehta D, Anacker C, Rex-Haffner M, Pruessner JC, Pariante CM, Pace TW, Mercer KB, Mayberg HS, Bradley B, Nemeroff CB, Holsboer F, Heim CM, Ressler KJ, Rein T, Binder EB. Allele-specific FKBP5 DNA demethylation mediates gene-childhood trauma interactions. *Nature neuroscience*. 2013;16(1):33-41.

155. Wiechmann T, Röh S, Sauer S, Czamara D, Arloth J, Ködel M, Beintner M, Knop L, Menke A, Binder EB, Provençal N. Identification of dynamic glucocorticoid-induced methylation changes at the FKBP5 locus. *Clin Epigenetics*. 2019;11(1):83.
156. Alexander N, Rosenlöcher F, Stalder T, Linke J, Distler W, Morgner J, Kirschbaum C. Impact of antenatal synthetic glucocorticoid exposure on endocrine stress reactivity in term-born children. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(10):3538-44.
157. Bosquet Enlow M, Bollati V, Sideridis G, Flom JD, Hoxha M, Hacker MR, Wright RJ. Sex differences in effects of maternal risk and protective factors in childhood and pregnancy on newborn telomere length. *Psychoneuroendocrinology*. 2018;95:74-85.
158. Braun T, Weichert A, Gil HC, Sloboda DM, Tutschek B, Harder T, Dudenhausen JW, Plagemann A, Henrich W. Fetal and neonatal outcomes after term and preterm delivery following betamethasone administration in twin pregnancies. *Int J Gynaecol Obstet*. 2016;134(3):329-35.
159. Cheong JL, Hunt RW, Anderson PJ, Howard K, Thompson DK, Wang HX, Bear MJ, Inder TE, Doyle LW. Head growth in preterm infants: correlation with magnetic resonance imaging and neurodevelopmental outcome. *Pediatrics*. 2008;121(6):e1534-40.
160. Cooke RW, Foulder-Hughes L. Growth impairment in the very preterm and cognitive and motor performance at 7 years. *Archives of disease in childhood*. 2003;88(6):482-7.
161. Gale CR, O'Callaghan FJ, Bredow M, Martyn CN. The influence of head growth in fetal life, infancy, and childhood on intelligence at the ages of 4 and 8 years. *Pediatrics*. 2006;118(4):1486-92.
162. Hack M, Breslau N, Weissman B, Aram D, Klein N, Borawski E. Effect of very low birth weight and subnormal head size on cognitive abilities at school age. *The New England journal of medicine*. 1991;325(4):231-7.
163. Stathis SL, O'Callaghan M, Harvey J, Rogers Y. Head circumference in ELBW babies is associated with learning difficulties and cognition but not ADHD in the school-aged child. *Developmental medicine and child neurology*. 1999;41(6):375-80.

## 7. Anhang

### 7.1. Übersicht der Regressionsanalysen für DNA Methylierungen

Chromosomen	Basenpaarposition	CpG Name	Einflussfaktor: BET		Einflussfaktor: Geschlecht		Einflussfaktor: BET x Geschlecht	
			nominaler p-Wert	p-Wert nach FDR Korrektur	nominaler p-Wert	p-Wert nach FDR Korrektur	nominaler p-Wert	p-Wert nach FDR Korrektur
5	142658828	cg23273257	.09	1	.99	1	.70	1
5	142659682	cg26081259	.87	1	.38	1	.92	1
5	142677292	cg13514002	.27	1	.34	1	.23	1
5	142689858	cg24801588	.47	1	.85	1	.38	1
5	142690959	cg00407401	.42	1	.72	1	.91	1
5	142692961	cg19457823	.78	1	.81	1	.24	1
5	142695619	cg12741214	.71	1	.11	1	.85	1
5	142695636	cg04457787	.56	1	.64	1	.34	1
5	142696594	cg20728768	.49	1	.11	1	.29	1
5	142697868	cg25708981	.19	1	.41	1	.14	1
5	142702733	cg19645279	.05	1	.17	1	.40	1
5	142718549	cg19176661	.66	1	.93	1	.88	1
5	142721796	cg07715663	.80	1	.20	1	.75	1
5	142727470	cg24052866	.53	1	.11	1	.92	1
5	142729377	cg22233604	.43	1	.18	1	.66	1
5	142729913	cg03857453	.77	1	.17	1	.14	1
5	142730701	cg15115787	.41	1	.77	1	.88	1
5	142732502	cg12888360	.19	1	.83	1	.25	1
5	142733619	cg08695103	.52	1	.56	1	.69	1
5	142735238	cg14621978	.62	1	.12	1	.63	1
5	142740314	cg18484679	.44	1	.50	1	.44	1
5	142757011	cg16586394	.21	1	.43	1	.67	1
5	142757312	cg25535999	.86	1	.41	1	.45	1
5	142759375	cg03746860	.29	1	.30	1	.05	1
5	142762454	cg20598211	.33	1	.37	1	.26	1
5	142762613	cg05483455	.24	1	.94	1	.58	1
5	142768048	cg16594263	.19	1	.32	1	.80	1
5	142769612	cg16535116	.70	1	.04	1	.78	1
5	142769791	cg05900547	.95	1	.56	1	.77	1
5	142770757	cg19432243	.39	1	.14	1	.74	1
5	142770782	cg19820298	.36	1	.33	1	.89	1
5	142776274	cg27107893	.22	1	.70	1	.27	1
5	142779552	cg06613263	.64	1	.40	1	.31	1
5	142780254	cg17342132	.42	1	.47	1	.49	1
5	142780439	cg07742588	.09	1	.49	1	.99	1
5	142780486	cg00294552	.48	1	.07	1	.16	1
5	142780531	cg16219186	.08	1	.78	1	.11	1
5	142780693	cg08845721	.28	1	.04	1	.63	1
5	142780984	cg12969488	.83	1	.52	1	.39	1
5	142781498	cg07733851	.49	1	.37	1	.59	1
5	142781532	cg18998365	.97	1	.31	1	.61	1
5	142781723	cg27122725	.59	1	.45	1	.57	1
5	142781736	cg06952416	.93	1	.61	1	.46	1
5	142782072	cg06521673	.37	1	.36	1	.13	1
5	142782415	cg17617527	.04	1	.04	1	.15	1
5	142782791	cg20753294	.67	1	.24	1	.76	1
5	142782827	cg18146873	.25	1	.52	1	.29	1
5	142783379	cg00629244	.83	1	.11	1	.96	1
5	142783383	cg11152298	.63	1	.18	1	.42	1
5	142783385	cg18019515	.07	1	.37	1	.58	1
5	142783569	cg17860381	.87	1	.02	1	.49	1
5	142783607	cg04111177	.99	1	.05	1	.98	1
5	142783621	cg15910486	.87	1	.82	1	.87	1
5	142783639	cg15645634	.31	1	.82	1	.20	1
5	142783831	cg14939152	.36	1	.52	1	.80	1
5	142783843	cg18068240	.004	.63	.56	1	.91	1
5	142783848	cg21209684	.17	1	.24	1	.84	1
5	142784019	cg01967637	.60	1	.10	1	.95	1
5	142784168	cg22402730	.17	1	.09	1	.23	1
5	142784187	cg19135245	.81	1	.10	1	.96	1
5	142784222	cg26464411	.97	1	.88	1	.60	1

Tabelle 6: Daten der Regressionsanalysen für das NR3C1 Gen

Chromosomen	Basenpaarposition	CpG Name	Einflussfaktor: BET		Einflussfaktor: Geschlecht		Einflussfaktor: BET x Geschlecht	
			nominaler p-Wert	p-Wert nach FDR Korrektur	nominaler p-Wert	p-Wert nach FDR Korrektur	nominaler p-Wert	p-Wert nach FDR Korrektur
5	142784278	cg07515400	.28	1	.34	1	.03	1
5	142784323	cg06968181	.99	1	.80	1	.37	1
5	142784382	cg18849621	.64	1	.10	1	.76	1
5	142784462	cg16335926	.25	1	.02	1	.66	1
5	142784522	cg10847032	.12	1	.55	1	.65	1
5	142784721	cg21702128	.09	1	.48	1	.55	1
5	142784982	cg14558428	.09	1	.89	1	.59	1
5	142785172	cg24026230	.05	1	.53	1	.66	1
5	142785258	cg13648501	.09	1	.71	1	.59	1
5	142785455	cg18718518	.06	1	.21	1	.97	1
5	142785501	cg13764763	.17	1	.31	1	.81	1
5	142786405	cg27345592	.04	1	.09	1	.54	1
5	142788776	cg07528216	.07	1	.10	1	.64	1
5	142792698	cg16224829	.82	1	.02	1	.71	1
5	142793924	cg01751279	.76	1	.73	1	.43	1
5	142798375	cg23430507	.62	1	.33	1	.53	1
5	142802329	cg17349736	.92	1	.002	.33	.10	1
5	142806343	cg14438279	.71	1	.63	1	.78	1
5	142807171	cg25579735	.23	1	.42	1	.25	1
5	142808610	cg08423118	.30	1	.29	1	.27	1
5	142814315	cg23776787	.29	1	.13	1	.14	1
5	142814388	cg03906910	.65	1	.61	1	.59	1
5	142814827	cg08818984	.97	1	.01	1	.58	1
5	142814934	cg26720913	.80	1	.02	1	.81	1
5	142815463	cg07589972	.61	1	.66	1	.75	1
5	142815469	cg12466613	.77	1	.52	1	.77	1
5	142815807	cg21979215	.42	1	.67	1	.62	1
5	142816417	cg01294526	.89	1	.11	1	.66	1

Tabelle 7: Daten der Regressionsanalysen für das NR3C1 Gen (Fortführung Tabelle 6)

Chromosomen	Basenpaarposition	CpG Name	Einflussfaktor: BET		Einflussfaktor: Geschlecht		Einflussfaktor: BET x Geschlecht	
			nominaler p-Wert	p-Wert nach FDR Korrektur	nominaler p-Wert	p-Wert nach FDR Korrektur	nominaler p-Wert	p-Wert nach FDR Korrektur
16	67463902	cg04712664	.15	1	.23	1	.80	1
16	67464093	cg15690037	.02	1	.001	.09	.52	1
16	67464331	cg27130954	.64	1	.003	.47	.72	1
16	67464483	cg08711598	.90	1	.01	1	.79	1
16	67464503	cg02955911	.84	1	.60	1	.56	1
16	67464522	cg16545496	.17	1	.02	1	.28	1
16	67464610	cg02322203	.66	1	.02	1	.97	1
16	67464707	cg08789908	.07	1	.14	1	.73	1
16	67464829	cg07545640	.70	1	.41	1	.21	1
16	67464868	cg12790440	.54	1	.80	1	.03	1
16	67464878	cg10686375	.91	1	.56	1	.71	1
16	67464886	cg13753571	.73	1	.07	1	.70	1
16	67464891	cg20556751	.93	1	.03	1	.51	1
16	<b>67465029</b>	<b>cg24270678</b>	.03	1	<b>8.99x10<sup>-5</sup></b>	<b>.01</b>	.03	1
16	67465042	cg12670061	.36	1	.05	1	.07	1
16	67465455	cg07724674	.41	1	.11	1	.53	1
16	67465461	cg20981893	.58	1	.13	1	.17	1
16	67465561	cg12081455	.36	1	.83	1	.82	1
16	67466260	cg01443318	.14	1	.003	.40	.90	1
<b>16</b>	<b>67466470</b>	<b>cg13678281</b>	.30	1	<b>5.86x10<sup>-6</sup></b>	<b>.001</b>	.87	1
16	67467751	cg02734600	.93	1	.51	1	.93	1
16	67469937	cg09807841	.98	1	.03	1	.74	1
16	67471172	cg04750517	.19	1	.87	1	.02	1

Tabelle 8: Daten der Regressionsanalysen für das 11βHSD2 Gen



Chromosomen	Basenpaarposition	CpG Name	Einflussfaktor: BET		Einflussfaktor: Geschlecht		Einflussfaktor: BET x Geschlecht	
			nominaler p-Wert	p-Wert nach FDR Korrektur	nominaler p-Wert	p-Wert nach FDR Korrektur	nominaler p-Wert	p-Wert nach FDR Korrektur
6	35544468	cg02665568	.12	1	.11	1	.34	1
6	35551624	cg16912838	.29	1	.31	1	.51	1
6	35551932	cg06087101	.44	1	.68	1	.06	1
<b>6</b>	<b>35558488</b>	<b>cg22363520</b>	<b>4.76x10<sup>-11</sup></b>	<b>7.71x10<sup>-9</sup></b>	.43	1	.70	1
6	35565116	cg10300814	.29	1	.10	1	.15	1
6	35569471	cg07633853	.11	1	.29	1	.68	1
6	35570224	cg14284211	.27	1	.85	1	.82	1
6	35570573	cg13344434	.49	1	.38	1	.71	1
6	35592694	cg16005389	.93	1	.23	1	.49	1
6	35603143	cg16052510	.48	1	.18	1	.92	1
6	35611554	cg04791658	.54	1	.34	1	.72	1
6	35611576	cg09268536	.27	1	.34	1	.04	1
6	35611611	cg04137760	.28	1	.16	1	.44	1
6	35612351	cg08586216	.02	1	.84	1	.98	1
6	35618763	cg05039098	.24	1	.45	1	.33	1
6	35619165	cg07696519	.89	1	.15	1	.80	1
6	35619239	cg26495008	.25	1	.83	1	.73	1
6	35619454	cg11905112	.49	1	.98	1	.36	1
6	35631009	cg01839003	.13	1	.08	1	.68	1
6	35631736	cg07061368	.29	1	.74	1	.55	1
6	35633557	cg21789597	.84	1	.20	1	.78	1
6	35635985	cg19014730	.08	1	.46	1	.26	1
6	35642470	cg06409316	.52	1	.57	1	.79	1
6	35645341	cg17085721	.70	1	.39	1	.02	1
6	35652521	cg14642437	.40	1	.07	1	.96	1
6	35654363	cg03546163	.19	1	.64	1	.28	1
6	35655764	cg00862770	.53	1	.08	1	.66	1
6	35656242	cg00140191	.45	1	.90	1	1.0	1
6	35656590	cg10913456	.07	1	.07	1	.39	1
6	35656758	cg16012111	.07	1	.59	1	.23	1
6	35656848	cg07843056	.13	1	.78	1	.44	1
6	35656906	cg01294490	.98	1	.54	1	.74	1
6	35657040	cg03245912	.66	1	.03	1	.53	1
6	35657180	cg20813374	.60	1	.62	1	.51	1
6	35657202	cg00130530	.05	1	.80	1	.19	1
6	35657921	cg08636224	.80	1	.10	1	.85	1
6	35659141	cg03591753	.73	1	.40	1	.31	1
6	35662800	cg08642543	.13	1	.63	1	.73	1
6	35677981	cg03098337	.27	1	.62	1	.97	1
6	35681420	cg24295963	.75	1	.01	1	.36	1
6	35687310	cg14339974	.82	1	.77	1	.67	1
6	35687457	cg15929276	.44	1	.41	1	.23	1
6	35693573	cg23416081	.001	.11	.89	1	.73	1
6	35695489	cg06937024	.67	1	.35	1	.34	1
6	35695859	cg11845071	.12	1	.17	1	.35	1
6	35695934	cg00610228	.90	1	.99	1	.37	1
6	35696061	cg07485685	.04	1	.77	1	.56	1
6	35696300	cg17030679	.27	1	.03	1	.06	1
6	35696726	cg25563198	.90	1	.65	1	.45	1
6	35696870	cg25114611	.62	1	.80	1	.77	1

Tabelle 9: Daten der Regressionsanalysen für das FKBP5 Gen

## 7.2. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sarah Kraemer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Der Einfluss der Betamethasontherapie zur Lungenreifung auf das Methylierungsprofil der glukokortikoid-responsiven Gene NR3C1, 11 $\beta$ HSD2, FKBP5 und die Telomerlänge in humanem Plazentagewebe (The influence of betamethasone treatment for fetal lung maturation on methylation levels of the glucocorticoid-responsive genes NR3C1, 11 $\beta$ HSD2, FKBP5 and telomere length im human placenta) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

### **7.3. Lebenslauf**

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

#### **7.4. Danksagung**

Mein Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. rer. nat. Entringer für die Überlassung des interessanten Themas sowie für ihre kontinuierliche fachliche und methodische Unterstützung, ihre Geduld, ihre konstruktive Kritik bei der Bearbeitung der Forschungsfrage und ihre intensiven Korrekturen. Des Weiteren danke ich Herrn PD Dr.med. Braun für die Bereitstellung der Plazentaprobe, die bereits durch seine Arbeitsgruppe gesammelt worden waren, die Möglichkeit die DNA Isolation in seinem Labor durchzuführen sowie seiner hilfsbereiten Betreuung und den detaillierten Korrekturvorschlägen. Auch möchte ich mich für die Unterstützung, hilfreiche Einarbeitung und praktischen Tipps während der Laborarbeiten bei Frau Ehrlich bedanken.

Ich danke Frau Rex-Haffner und Dr. rer. nat. Czamara vom Münchener Max Planck Institut für die Erstellung der Methylierungsanalysen und ihre ständige Bereitschaft meine Fragen zu klären und meine Ausarbeitung mit fachlicher Expertise gegenzulesen. Zusätzlich möchte ich der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Nawrot danken, die die Telomeranalysen an der Universität Hasselt, Belgien, durchführten.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir den Weg zu einer universitären Ausbildung überhaupt erst ermöglichte, und meinem Partner, der mich immer zur Fertigstellung der Arbeit ermutigte und mich auf dem Weg dorthin stets unterstützte.