

Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie  
der Universitätsmedizin Rostock  
Direktor: Prof. Dr. Dr. Johannes Thome

**Einfluss der Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS) und der  
ADHS-Medikamente auf den circadianen Rhythmus**

**Inauguraldissertation**  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
der  
Universitätsmedizin Rostock

**vorgelegt von**  
Maria Schenk,  
geboren am 25.01.1992 in Demmin  
aus Thulendorf

Rostock, März 2022

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. phil. Johannes Thome  
Universitätsmedizin Rostock, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. soc. Dipl.-Psych. Peter Kropp  
Universitätsmedizin Rostock, Institut für medizinische Psychologie und Soziologie

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Hans Grabe  
Universitätsmedizin Greifswald, Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie

Einreichung: März 2022

Verteidigung: 08. November 2022

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung .....	1
1.1.1 Prävalenz.....	1
1.1.2 Kernsymptome und Probleme im gesellschaftlichen Leben.....	2
1.1.3 Erblichkeit und Risikofaktoren .....	3
1.2.4 Diagnosestellung.....	4
1.1.5 Komorbidität .....	5
1.1.6 Therapiemöglichkeiten .....	6
1.2 Schlafstörungen .....	7
1.2.1 Insomnie.....	7
1.2.2 Schlafstörungen als Komorbidität bei ADHS.....	7
1.2.3 Möglichkeiten der Diagnostik von Schlafstörungen.....	9
1.3 Circadiane Rhythmik.....	11
1.3.1 Grundlagen.....	11
1.3.2 Chronotypen.....	12
1.3.3 Circadiane Rhythmusstörungen .....	13
1.3.4 Clock-Gene .....	14
1.3.5 Bedeutung von Fibroblasten als In-vitro-Modell.....	16
1.3.6 Besonderheiten der circadianen Rhythmik bei ADHS .....	18
1.3.7 Besonderheiten der circadianen Rhythmik unter Einsatz von ADHS-Medikation..	19
1.4 Fragestellung/Hypothese .....	21
<b>2 Probanden und Methodik .....</b>	<b>22</b>
2.1 Probanden .....	22
2.1.1 Studiendesign .....	22
2.1.2 Probandenkollektiv .....	22
2.1.3 Gruppeneinteilung.....	23
2.1.4 Zeitlicher Ablauf.....	23
2.2 Methodik.....	25
2.2.1 Testpsychologie .....	25
2.2.2 Aktigraphie .....	27

2.2.3 Kultivierung der Fibroblasten .....	29
2.2.4 Real-Time PCR .....	30
2.2.5 Biolumineszenz.....	32
2.2.6 Statistische Auswertung.....	35
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>39</b>
3.1 Soziodemografie .....	39
3.2 Chronotypisierung nach D-MEQ.....	43
3.3 Analyse aktigraphischer Parameter .....	45
3.4 In vitro gemessene Expressionsverläufe der Clock-Gene .....	54
3.4.1 Real-Time PCR .....	54
3.4.2 Biolumineszenz.....	64
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>67</b>
<b>5 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>77</b>
<b>6 Thesen .....</b>	<b>IV</b>
<b>7 Anhang .....</b>	<b>VI</b>
7.1 Abkürzungsverzeichnis .....	VI
7.2 Abbildungsverzeichnis .....	X
7.3 Tabellenverzeichnis .....	XIV
7.4 Danksagung .....	XV
7.5 Selbständigkeitserklärung.....	XVI

Ausschließlich zum Zweck der besseren Lesbarkeit wird in dieser Arbeit bei personenbezogenen Hauptwörtern und Personenbezeichnungen anstatt der geschlechtsspezifischen Schreibweise oder Mehrfachbezeichnung das generische Maskulin verwendet. Entsprechende Begriffe gelten im Sinne der Gleichberechtigung ausdrücklich für alle Geschlechter gleichermaßen und beinhalten keinerlei Wertung.

# **1 Einleitung**

## **1.1 Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung**

### **1.1.1 Prävalenz**

Die Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS), ist mit einer Prävalenz von etwa 5 % bei 7–14 Jährigen die häufigste neuropsychiatrische Erkrankung im Kindesalter (Polanczyk et al. 2007; Matthews et al. 2014). Ging man anfangs davon aus, dass es sich hierbei um eine Störung im Kindesalter handelt, die im Verlauf der Pubertät ausheilt, zeigen neuere Studien, dass dies nicht der Fall ist (Wender et al. 2001; Edel und Vollmoeller 2006). In einer Metaanalyse aus dem Jahr 2005 beschreiben Faraone et al. (2006), dass bei 15 % der Patienten, in deren Kindheit ADHS diagnostiziert wurde, auch im Alter von 25 Jahren noch das Vollbild der Erkrankung vorlag. Bei 65 % der einst betroffenen Kinder war eine partielle Persistenz im jungen Erwachsenenalter nachweisbar. Neuere Studien gehen davon aus, dass sogar 66 % der Betroffenen auch im mittleren Erwachsenenalter die Diagnosekriterien erfüllen und lediglich 17,8 % eine subklinische Form der ADHS zeigen (Karam et al. 2015). Auch eine Abnahme der Prävalenz mit dem Alter ist zu verzeichnen (Edel & Vollmoeller 2006). Dabei sind die Faktoren, die zum Fortbestehen der Erkrankung beitragen noch weitgehend unbekannt. Die Schwere der Erkrankung sowie die Behandlung spielen dabei jedoch eine Rolle (Kessler et al. 2005a). Für die Prävalenz in der erwachsenen Bevölkerung lässt sich dabei ein Anteil zwischen 1–6 % annehmen (Wender et al. 2001; Polanczyk et al. 2007; Graaf et al. 2008). Damit stellt ADHS auch im Erwachsenenalter eine relevante psychiatrische Erkrankung in unserer Gesellschaft dar. Zeigt sich im Kindesalter mit 3:1 bis 4:1 noch eine deutlich häufigere Diagnosestellung bei Jungen als bei Mädchen, so nähert sich die Geschlechterverteilung im Erwachsenenalter an (Karam et al. 2015). Mit 1,6:1 wird aber auch hier die Diagnose ADHS beim männlichen Geschlecht häufiger gestellt als beim weiblichen (Stieglitz et al. 2012). Ein Grund hierfür kann sein, dass Mädchen und Frauen häufiger dem unaufmerksamen als dem hyperaktiv-impulsiven Typus zugeordnet werden können. Der unaufmerksame Typus ist vor allem in der Kindheit oft unterdiagnostiziert, da seine Symptome als weniger störend vom Umfeld empfunden werden. Eine hohe Dunkelziffer an weiblichen ADHS-Patientinnen ist also anzunehmen (Wender et al. 2001).

### **1.1.2 Kernsymptome und Probleme im gesellschaftlichen Leben**

ADHS ist eine psychiatrische Erkrankung, deren Symptome vor allem in den Bereichen Aufmerksamkeit, Hyperaktivität und Impulsivität liegen. Unaufmerksamkeit fällt auf, durch Schwierigkeiten bei der Aufrechterhaltung der Konzentration über einen längeren Zeitraum hinweg (Stieglitz et al. 2012). Betroffene wirken dabei sehr verträumt, machen viele Flüchtigkeitsfehler, vergessen oder verlieren vermehrt Gegenstände des täglichen Lebens und wirken unorganisiert. Auch ist eine vermehrte Ablenkbarkeit durch äußere Reize auffallend. Hyperaktivität macht sich bemerkbar durch körperliche Unruhe mit vermehrtem Bewegungsdrang, Schwierigkeiten, sich ruhig zu beschäftigen oder Aufgaben ruhig zu erledigen, sowie übermäßig vielem Reden. Impulsivität bezeichnet ein ungeduldiges, oft störendes Verhalten. Dabei fällt es den Patienten schwer, abzuwarten, bis sie an der Reihe sind, andere ausreden zu lassen, ohne sie zu unterbrechen, oder Handlungsimpulse zu unterdrücken, wenn diese unangemessen oder unangebracht sind (ebd.).

Die Auswirkungen dieser Symptome sind vielfältig. Oft bleiben die Patienten in der Schule und im Beruf unter den für ihren IQ zu erwartenden Leistungen (Mannuzza et al. 1993). Auch die sozialen Interaktionen sind sehr beeinträchtigt. Nicht selten werden Kinder wegen ihres störenden und zum Teil auch aggressiven Verhaltens ausgegrenzt, oft kommt es zu Problemen in der Eltern-Kind-Beziehung, Partnerschaftsprobleme treten gehäuft auf (Edel & Vollmoeller 2006). Die Störungen im Bereich der kognitiven, emotionalen und exekutiven Funktionen führen auch zu einem risikoreicheren Verhalten, damit einhergehend sind unter anderem Verkehrsdelikte (Philip et al 2015), Gesetzeskonflikte (Saylor & Amann 2016) und Substanzmissbrauch (Retz et al. 2007).

### **1.1.3 Erblichkeit und Risikofaktoren**

Lange Zeit wurden insbesondere Umweltfaktoren und das soziale Umfeld für das Auftreten von ADHS verantwortlich gemacht. Doch scheinen Faktoren wie diese nicht die alleinige Ursache des Erkrankens zu sein, sondern eher die Stärke der Ausprägung zu modulieren. Ursächlich ist vielmehr eine genetische Veranlagung, was durch Zwillings-, Adoptions- und Familienstudien belegt ist (Sharp et al. 2009).

Eine Metaanalyse ergab einen mittleren Wert der Vererbung von 76 %. Hierbei handelt es sich nicht um ein einzelnes Gen, das die Erblichkeit ausmacht, sondern um eine Vielzahl von Genen, die im Zusammenspiel einen komplexen Erbmechanismus bilden (Faraone et al. 2005). Zwei Gene, die häufig in Bezug zu ADHS gesetzt werden, sind das Dopaminrezeptor-D4-Gen (DRD4) und das Dopamintransporter-1-Gen (DAT1), deren Genprodukte eine Rolle im Stoffwechsel von Dopamin spielen (Turic et al. 2010). Dabei hat Dopamin im Gehirn einen entscheidenden Einfluss auf Bewegung, Kognition, Belohnung und Emotionen. Veränderungen des Stoffwechsels dieses Neurotransmitters haben somit Auswirkungen auf die genannten Funktionsbereiche (ebd.).

#### **1.2.4 Diagnosestellung**

Wie bei anderen psychiatrischen Erkrankungen handelt es sich auch bei der ADHS um eine Diagnose, die nicht durch spezifische mikrobiologische, pathologische oder physiologische Marker gemessen und gestellt werden kann (Wender et al. 2001). Im Vordergrund stehen deshalb die Beurteilung des subjektiven Erlebens des Patienten sowie die Beurteilung durch das soziale Umfeld hinsichtlich des Auftretens der ADHS-Hauptsymptome. Die Diagnosestellung erfolgt anhand der Kriterien der ICD-10 oder der DSM. Entscheidend ist hierbei, dass die Symptome mehr als sechs Monate in mehr als einem Lebensbereich auftreten und durch keine andere psychiatrische Erkrankung besser zu erklären sind. Je nach Ausprägung der Symptome werden ein *vorwiegend unaufmerksamer Typ*, ein *vorwiegend hyperaktiv-impulsiver Typ*, ein *kombinierter Typ* und ein *Residualtyp* unterschieden (American Psychiatric Association 2013).

Bei Jugendlichen ist der hyperaktiv-impulsive Typ mit 8 % am seltensten, 28 % der Betroffenen sind dem Mischtyp zuzuordnen und bei 64 % ist von einem unaufmerksamen Typus auszugehen (Smalley et al. 2007). Eine andere Studie über die Verteilung der Subtypen im Erwachsenenalter gibt Zahlen von 53 % bei Frauen und 48,6% bei Männern für den Mischtypen an, sowie eine überwiegende Aufmerksamkeitsstörung bei Männern in 33,1 % der Fälle und bei Frauen in 40,2 %. Wieder ist der überwiegend hyperaktive Typus der seltenste mit 14 % der männlichen und 11,2 % der weiblichen Betroffenen (Retz-Junginger et al. 2012). Insgesamt lässt sich beobachten, dass die im Kindesalter dominierende Hyperaktivität mit zunehmendem Alter der Betroffenen nachlässt und vor allem Probleme durch Aufmerksamkeits- und Konzentrationsstörungen in den Vordergrund treten (Willcutt 2012). Bei der ADHS handelt es sich definitionsgemäß um eine psychiatrische Erkrankung, die ihren Beginn in der Kindheit hat. (American Psychiatric Association 2013; World Health Organisation [WHO] 2016). Bei einem großen Anteil der erwachsenen Patienten, bei denen eine ADHS vorliegt, ist diese nicht schon in ihrer Kindheit diagnostiziert worden. Um trotzdem das Kriterium des Beginns in der Kindheit erfüllen zu können, muss eine retrospektive Beurteilung diesbezüglich erfolgen. Hierfür wurde zum Beispiel die aus 61 Items bestehende Wender Utah Rating Scale (WURS) (Ward et al. 1993) sowie deren aus 25 Items bestehende Kurzform (WURS-k) (Retz-Junginger et al. 2003) entwickelt. Die Beantwortung der Fragen erfolgt hierbei durch Selbsteinschätzung und mit Angabe der Ausprägungsstärke der jeweiligen Symptome.

### **1.1.5 Komorbidität**

Ein großes Problem bei der Diagnosestellung stellt die Abgrenzung gegenüber anderen psychiatrischen Erkrankungen dar, denn diese können sowohl wichtige Differentialdiagnosen als auch mit der ADHS einhergehende Komorbiditäten sein. Durch sich zum Teil überschneidende Symptome der ADHS mit denen der Komorbiditäten ist eine eindeutige Diagnose nur durch sorgfältige Tests zu stellen, besonders dann, wenn die komorbiden Symptome im Vordergrund stehen (McIntosh et al. 2009).

Vor allem im Erwachsenenalter tritt eine ADHS selten als völlig isolierte Erkrankung auf. Neben den Kardinalsymptomen gibt es eine Vielzahl von Komorbiditäten, welche zusätzliche Schwierigkeiten für die Betroffenen mit sich bringen. Im Rahmen einer Stichprobe von 45 Patienten gaben Torgersen et al. (2006) für das Vorliegen einer komorbiden Störung einen Wert von 86,7 % an. Unter anderen wurden Major Depressionen angegeben, deren Lebenszeitprävalenz sich laut Studie auf 53,3 % belief (ebd.). Eine erhöhte Depressions- und Suizidrate im Erwachsenenalter beschreiben auch Chronis-Tuscano et al. (2010). Tritt eine Major Depression auf, ist das anschließende Eintreten einer bipolaren Störung bei vorliegender ADHS wahrscheinlicher als bei Nicht-ADHS-Patienten (Chen et al. 2014). Aber auch antisoziales Verhalten ist bei 44,4 % der ADHS-Patienten festgestellt worden, sowie Beeinträchtigungen beim Lernen bei 22 % der Betroffenen (Torgersen et al. 2006). Durch das zum Teil risikofreudigere Verhalten kommt es oft zu Missbrauch von Substanzen, wie Nikotin, Alkohol oder Cannabis, sodass die Substanzabhängigkeitsraten in dieser Gruppe erhöht sind (Lee et al. 2011a). Eine Assoziation besteht auch mit Persönlichkeitsstörungen (PS), wobei die Cluster-B PS von besonderer Bedeutung zu sein scheinen. Hierzu zählen die emotional-instabile PS und die dissoziale PS (van Dijk et al. 2012). Schlafstörungen stellen bei ADHS-Patienten ein weiteres großes Problem dar (Owen 2005), auf das im Abschnitt 1.2.2 genauer eingegangen wird.

### **1.1.6 Therapiemöglichkeiten**

Bei der Behandlung von ADHS ist es wichtig, auf das individuelle Beschwerdebild des Einzelnen einzugehen und so eine individualisierte Therapie zusammen mit dem Patienten zu erstellen. Ob eine Therapie erforderlich ist, hängt von der Art der Symptome sowie deren Ausprägung und der damit einhergehenden Beeinträchtigung des Alltags ab. Auch die vielfältigen Komorbiditäten, die bei ADHS-Patienten zu finden sind, bedürfen oftmals einer Behandlung. Häufig bietet sich daher eine Kombination aus Psychotherapie, Pharmakotherapie und weiteren multimodalen Therapieansätzen an (Müller et al. 2011).

In der Pharmakotherapie stellen Stimulanzien die Mittel der ersten Wahl zur Behandlung von ADHS dar (Benkert & Hippius 2017). Sie sind lipophil und können deshalb die Blut-Hirn-Schranke überwinden und im Zentralnervensystem ihre stimulierende Wirkung entfalten, indem sie dort Neurotransmitter wie Noradrenalin und Dopamin aus synaptischen Speichern freisetzen. Es handelt sich also um eine indirekt sympathomimetische Wirkung. Dysfunktionen im dopaminergen System verursachen neben gesteigerter Wachheit vor allem Unaufmerksamkeit, Verlust der Impulskontrolle und Hyperaktivität, welche auch die Kernsymptome der ADHS darstellen (ebd.). Mit Gabe von Stimulanzien wird pharmakologisch in das dopaminerge System eingegriffen und versucht das Gleichgewicht der Neurotransmitter wiederherzustellen und auf diese Weise die Symptome der Patienten zu therapieren (Müller et al. 2011). Eines der meist verbreiteten Stimulanzien in der ADHS-Therapie ist Methylphenidat, das auch im Erwachsenenalter zur Therapie der ADHS zugelassen ist. Wie bei anderen Stimulanzien auch ist ein erhöhtes Abhängigkeitspotenzial beschrieben, sodass Methylphenidat dem Betäubungsmittelgesetz unterliegt und nur nach sorgfältiger Diagnosestellung verschrieben werden sollte (Benkert & Hippius 2017). Atomoxetin ist ein weiteres Medikament, das zur Therapie erwachsener ADHS-Patienten zugelassen ist. Hierbei handelt es sich nicht um ein Psychostimulans, da es keine Verschiebung des Dopamingleichgewichts im mesocorticolimbischen Belohnungssystem bewirkt. Es bewirkt allerdings eine Wiederaufnahmehemmung von Noradrenalin und führt zu einer Konzentrationserhöhung dieses Transmitters im synaptischen Spalt, insbesondere in Zellen des präfrontalen Kortex. Eine Abhängigkeit ist in der Regel nicht zu erwarten, weshalb es beim Vorliegen einer komorbiden Suchterkrankung dem Methylphenidat vorzuziehen ist. Gleichermaßen gilt beim Auftreten von Tic- oder Angststörungen als Komorbiditäten (Benkert & Hippius 2017).

## **1.2 Schlafstörungen**

### **1.2.1 Insomnie**

Der Schlaf ist ein wichtiger Bestandteil unseres täglichen Lebens. Viele Einzelheiten über die genaue Funktion und Wirkung des Schlafs sind bisher noch nicht geklärt und deshalb Inhalt vieler Forschungen. Er ist wichtig für die Entwicklung und Regeneration des Gehirns und des gesamten Organismus, für Lernprozesse und Verarbeitung von Erlebtem. Gesunder Schlaf ist auch wichtig für die Aufrechterhaltung der Konzentrationsfähigkeit. Er kann durch äußere Faktoren wie Licht und Lärm, aber auch durch innere Faktoren wie psychische und physische Erkrankungen beeinflusst werden (Schlack et al. 2013).

Insomnie bezeichnet einen Mangel an Schlaf sowie eine Verminderung der Schlafqualität, wodurch es zu vermehrter Tagesmüdigkeit kommt. Das Ungleichgewicht zwischen Schlafbedürfnis und tatsächlicher Schlafenszeit kann unterschiedliche Ursachen haben. Eingeteilt werden kann diese Erkrankung in primäre und sekundäre Insomnie. Als sekundär wird sie beschrieben, wenn sie Folge einer anderen körperlichen oder psychischen Erkrankung ist oder durch andere Faktoren wie Medikamente oder Drogen hervorgerufen wird. Tritt die Insomnie nicht als Folge von Erkrankungen oder als Nebenwirkung auf, wird von primärer Insomnie gesprochen. Zu den Charakteristika zählen eine verlängerte Zeit bis zum Einschlafen, häufiges nächtliches Erwachen oder vorzeitiges Erwachen am Morgen (WHO 2016). Eine deutliche Beeinträchtigung der beruflichen Leistungen, der Stimmungslage und der sozialen Interaktionen resultieren (Schlack et al. 2013).

### **1.2.2 Schlafstörungen als Komorbidität bei ADHS**

Schlafstörungen stellen auch bei ADHS-Patienten ein großes Problem dar, über das sogar bis zu 70–83 % der Betroffenen klagen (Schredl et al. 2007; Sobanski et al 2008). Es wurde beobachtet, dass nicht nur das Zubettgehen verzögert ist, sondern auch die Zeitspanne vom Zubettgehen bis zum letztendlichen Einschlafen, genannt Einschlaflatenz (Van Veen et al. 2010; Fargason et al. 2013). Auch das morgendliche Aufstehen stellt sich als erschwert dar, gleichzeitig wird die Schlafqualität als niedriger empfunden. Alles zusammen führt zu einer deutlich erhöhten Tagesmüdigkeit im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Surman et al. 2009). Diese objektive Tagesmüdigkeit wurde bei 35 % der erwachsenen ADHS-Patienten gefunden (Bioulac et al. 2015). Wie die Erkrankung ADHS selbst, beginnen auch die Schlafstörungen

schon bei vielen Betroffenen im Kindesalter und bestehen im Erwachsenenalter fort (Van Veen et al. 2010). Bereits in der Kindheit zeigt sich eine vermehrte Tagesschläfrigkeit verglichen mit nicht betroffenen Gleichaltrigen, was durch eine Verminderung von Schlafeffizienz und totaler Schlafzeit verursacht sein könnte (Golan et al. 2004). Gleiches zeichnet sich auch im Erwachsenenalter ab. Zusätzlich ergeben sich signifikant höhere Werte für die Einschlaflatenz und die Häufigkeit des nächtlichen Erwachens in der Patientengruppe (Schredl et al. 2007). Auch Boonstra et al. (2007) zeigten mittels Aktigraphie bei erwachsenen ADHS-Patienten eine geringere Schlafeffizienz und eine erhöhte Frequenz der nächtlichen Schlafunterbrechungen auf.

Ursachen für die geringe Schlafqualität, die erhöhte motorische Aktivität in der Nacht und das häufigere Erwachen können die mit ADHS assoziierten Störungen des Schlafs sein. Hierzu zählen das Schlaf-Apnoe Syndrom (Surman et al. 2006), Narkolepsie (Osterloo et al. 2006), sowie Schlaf-assoziierte Epilepsie (Reilly 2011) und das Restless-Legs-Syndrom (Wagner et al. 2004). Zudem zeichnete sich in Studien eine Veränderung der Schlafphasenverteilung dahingehend ab, dass die erste Phase, die Einschlafphase, einen vergrößerten Anteil am Schlaf hat, die Phasen des REM-Schlafs dagegen aber einen verminderten Anteil ausmachen (Sobanski et al. 2008).

Schon nach wenigen Tagen Schlafmangel stellt sich eine Verschlechterung der kognitiven Fähigkeiten ein, die als nachlassende Reaktionszeit und vermehrtes Auftreten von Unachtsamkeitsfehlern objektivierbar ist. Auch eine vermehrte Impulsivität ist zu beobachten (Axelsson et al. 2008). Da es sich hierbei zum Teil auch um die Kernsymptome der ADHS handelt, ist davon auszugehen, dass sich mit Zunahme der Schwere der Schlafstörungen auch die Ausprägung dieser Symptome verstärkt (Becker et al. 2014). Ein Screening der Patienten auf Schlafstörungen kann sinnvoll sein, denn deren adäquate Behandlung kann positive Effekte auf die Impulsivität und Hyperaktivität haben, da die Erholsamkeit des Schlafes starken Einfluss auf die Stärke der ADHS-Symptome hat (Schredl et al. 2007).

Die medikamentöse Therapie der ADHS wirkt sich andersherum auch auf den Schlaf aus. Kooij et al. (2001) verglichen in einer Studie ADHS-Patienten vor Therapie sowie nach dreiwöchiger Therapie mit Stimulanzen jeweils mit gesunden Kontrollpersonen. Vor Therapiebeginn zeigte sich in der Aktigraphie eine erhöhte motorische Aktivität während der Nacht in der Patientengruppe. Nach der Stimulanzentherapie war eine signifikante Reduktion der nächtlichen Aktivität feststellbar (Kooij et al. 2001). Vergleichbare Ergebnisse erhielten auch Sobanski et al. (2008), die die Wirksamkeit der Pharmakotherapie mittels

Polysomnographie (PSG) überprüften. Auch hier zeigte sich eine Verringerung der nächtlichen Aktivität (Sobanski et al. 2008). Übereinstimmend konnte auch eine Abnahme der absoluten Schlafzeit nach Einnahme von Methylphenidat und Atomoxetin gefunden werden. Die Reduktion kann einerseits auf eine längere Zeitspanne bis zum Einsetzen des Schlafs zurückgeführt werden (Sangal et al. 2006; Corkum et al. 2008; Antle et al. 2012; Hvolby 2015), andererseits auch auf eine Zunahme der nächtlichen Wachphasen unter Medikation (Sangal et al. 2006; Corkum et al. 2008; Ironside et al. 2010; Hvolby 2015). Die Einschlafstörungen waren dabei unter Methylphenidat stärker ausgeprägt als unter Atomoxetin. Vor allem in Hinblick auf das Aufwachen am Morgen und die Schlafqualität zeigte sich Atomoxetin deutlich günstiger als Methylphenidat (Sangal et al. 2006). Insgesamt wurde der Schlaf nach Einnahme von Methylphenidat oder Atomoxetin als erholsamer bewertet (Kooij et al. 2001; Boonstra et al. 2007; Sobanski et al. 2008).

### **1.2.3 Möglichkeiten der Diagnostik von Schlafstörungen**

Zur Diagnostik von Schlafstörungen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Neben dem Einsatz von Fragebögen, welche Auskunft über die subjektiv empfundene Qualität und Quantität des Schlafs geben, wird auch auf apparative Verfahren zurückgegriffen (Alwis et al. 2015). Eine sehr umfangreiche Methode zur Diagnostik von Schlafstörungen stellt die *PSG* dar, welche anhand von EEG-Mustern Schlaf- und Wachzustände ermittelt. Ein weitaus weniger aufwendiges Verfahren ist die *Aktigraphie*, bei der Schlaf und Wachheit durch Messung der körperlichen Aktivität aufgezeichnet werden. Länger andauernde Immobilität wird dabei als Schlaf gewertet, was einen großen Unterschied zum Verfahren der PGS darstellt. Der große Vorteil der Aktigraphie liegt im geringeren Kosten- und Zeitaufwand. Da es sich zumeist um ein Messgerät handelt, das ähnlich einer Armbanduhr am Handgelenk befestigt wird und Bewegungen misst, ist ein nächtlicher Aufenthalt im Schlaflabor nicht notwendig. Die Aufzeichnung des Schlafes mittels Aktigraphie erfolgt somit im natürlichen Umfeld des Probanden und kann problemlos auf längere Zeiträume ausgedehnt werden (Marino et al. 2013).

Das Verfahren der Aktigraphie ist gekennzeichnet durch eine hohe Sensitivität und eignet sich daher, um individuelle Muster der Schlaf- und Wachphasen bei gesunden Probanden aufzuzeichnen. Sie wird in der Schlafmedizin und im Rahmen klinischer Studien routinemäßig eingesetzt (Morgenthaler et al. 2007). Ein Nachteil ist allerdings die reduzierte

Genauigkeit bei der Erkennung nächtlicher Wachphasen. Somit wird bei der Aktigraphie, im Vergleich zur PSG, der Schlaf im Allgemeinen überschätzt und die nächtlichen Schlafunterbrechungen unterschätzt. Bei Beurteilung der Schlafqualität ist die reine Aktigraphie der PSG somit unterlegen (Sadeh 2011). Besonders gut geeignet scheint die Aktigraphie dagegen zur Darstellung von bestimmten Veränderungen des Schlafmusters, wie Nacht-zu-Nacht-Instabilitäten bei Insomnie, und zur Überprüfung von Therapieauswirkungen auf das Schlafverhalten (Sadeh 2011). Außerdem zeigt sich die Aktigraphie auch in der Diagnostik von Störungen der circadianen Rhythmik hilfreich, da sie in der Lage ist, rhythmische Aktivitätsmuster über einen längeren Zeitraum aufzuzeichnen. Vergleicht man die Daten über Ruhe- und Aktivitätsperioden von Patienten, die mittels PSG, dem Goldstandard zur Bestimmung des Schlafverhaltens, und Aktigraphie gewonnen wurden, so zeigt sich, dass die Aktigraphie zuverlässig die Ruheperioden von den Aktivitätsperioden zu unterscheiden vermag (Ancoli-Israel et al. 2003). Daraus lässt sich erkennen, dass es mittels Aktigraphie möglich ist, eine Verschiebung der Aktivitätsmuster im Tagesverlauf zu ermitteln. Für die Validität bei komplexeren Fragen zum Schlafverhalten, wie zum Beispiel zu Schlafqualität oder Schlafeffizienz, zeigten sich in Studien bisher jedoch unterschiedliche Ergebnisse, sodass ein routinemäßiger Einsatz zur Untersuchung komplexer Fragestellungen derzeit noch kritisch bewertet werden sollte, vor allem wenn es sich um Patientengruppen mit gestörtem Schlafverhalten handelt (Ancoli-Israel et al. 2003).

## 1.3 Circadiane Rhythmis

### 1.3.1 Grundlagen

Nahezu alle biologischen Prozesse in unserem Körper unterliegen tageszeitlichen Schwankungen, wobei ein Rhythmus zu beobachten ist, der etwa die Dauer eines Tages hat und deshalb circadian (circa = ungefähr, dies = Tag) genannt wird. Verantwortlich für diesen Rhythmus ist eine „endogene Uhr“, deren Hauptschrittmacher sich bei Säugetieren im Nucleus suprachiasmaticus (SCN) des Hypothalamus befindet. Daneben gibt es periphere Schrittmacher, welche wahrscheinlich in allen Körperzellen präsent sind. Sie sind dem SCN untergeordnet und werden auf hormoneller und neuronaler Ebene von ihm gesteuert (Yamazaki et al. 2000). Die Synchronisation des endogenen Zeitsystems erfolgt durch Zeitgeber, wobei es sich um täglich wiederkehrende Signale der Umwelt handelt. Neben Einflussfaktoren wie Temperatur (Barrett & Takahashi 1995) und sozialen Gegebenheiten (Aschoff et al. 1971) stellt Licht, welches durch die Erdrotation einen 24 Stunden Takt vorgibt, das wichtigste äußere Signal dar (Mohawk et al. 2012). Informationen über die Lichtverhältnisse werden von der Retina aufgenommen und an den SCN übermittelt. Von dort aus erfolgt durch Signalkaskaden die Synchronisation von zentralen und peripheren Schrittmachern. Eine wichtige Rolle dabei spielen die Hormone Melatonin und Cortisol (Duffy & Czeisler 2009).

Der von außen auffälligste circadiane Rhythmus bei Menschen ist der Wechsel zwischen Tag und Nacht und damit zwischen Schlaf und Aktivität. Unter alltäglichen Bedingungen wiederholt sich der Schlaf-Wach-Rhythmus mit einer Periodendauer von 24 Stunden. Hält man die Einflüsse durch äußere Zeitgeber konstant, zum Beispiel durch gleichbleibende Dunkelheit, so zeigen sich Verschiebungen in der Periodenlänge; der endogene Biorhythmus kommt zum Vorschein. Verschiedene Studienprotokolle konnten dabei einen endogenen Biorhythmus von etwas mehr als 24 Stunden nachweisen ( $24,18 \text{ h} \pm 0,15 \text{ h}$  [Czeisler et al. 1999];  $24,30 \text{ h} \pm 0,36 \text{ h}$  [Hiddinga et al. 1997]). Je nach Dauer der intrinsischen Periodik zeigte sich eine Verlagerung verschiedenster circadianer Biomarker, wie ein Abfall der Körpertemperatur, der nächtlichen Melatoninausschüttung und damit einhergehend eine veränderte zeitliche Schlafpräferenz (Lack et al. 2009).

Melatonin ist dabei das Hormon, welches unseren Schlaf am maßgeblichsten steuert. Synthetisiert und sezerniert wird es in der Glandula pinealis und ist dabei dem SCN untergeordnet. Die Sekretion des Hormons erreicht ihr Maximum in der Nacht, wobei auch die Länge der Dunkelphase entscheidend ist. Melatonin stellt dabei ein wichtiges Glied in der

Synchronisation und Regulation der circadianen Rhythmik zwischen zentralem Hauptschrittmacher und peripheren Körperzellen dar (Arendt 2000; Korf & Gall 2006; Claustrat & Leston 2015; Erren & Reiter 2015). Eine zeitliche Verschiebung der Sekretion führt zu Änderungen innerhalb der circadianen Signalkaskaden im Körper. Umgekehrt unterliegt aber Melatonin selbst auch in seiner Synthese und Sekretion einem endogenen Rhythmus, der vom SCN generiert wird (Arendt 2000). Durch veränderte Ausschüttungsmuster können Schlafstörungen und Verschiebungen der circadianen Rhythmik auftreten, welche eine Vielzahl von gesundheitlichen Folgen in den verschiedensten Fachgebieten der Medizin haben können (Claustrat & Leston 2015; Smolensky et al. 2016).

### 1.3.2 Chronotypen

Die Synchronisation der endogenen Uhr mit äußeren Einflüssen führt durch nachgeschaltete Signalkaskaden zu tageszeitabhängigen, physiologischen Veränderungen im Körper, welche auch das Verhaltensmuster beeinflussen (Czeisler et al. 1999). Die Fähigkeit, die endogene Rhythmik mit äußeren Einflüssen, den Zeitgebern, zu synchronisieren, führt zu interindividuell verschiedenen zeitlichen Präferenzen für die Verteilung von Aktivitäts- und Schlafperioden. Auch das Leistungsvermögen zu bestimmten Tageszeiten wird dadurch stark beeinflusst.

Anhand dieses Verteilungsmusters lassen sich Menschen in verschiedene Kategorien, genannt Chronotypen, einteilen. Dabei gibt es den Morgentyp, der durch eine Präferenz für frühes Zubettgehen am Abend und ein sehr zeitiges Aufstehen am Morgen gekennzeichnet ist. Auch seine physiologischen Rhythmen, wie den Verlauf der Körpertemperatur und der Melatoninsekretion, durchläuft er früher im Tagesverlauf. Dem entgegengesetzt ist der Abendtyp, dessen Verhalten von spätem Einschlafen am Abend und spätem Aufstehen am Morgen geprägt ist. Auch Phasen der höchsten Leistungsfähigkeit sind im Vergleich zu anderen Chronotypen nach hinten verschoben. Wie auch beim Morgentyp findet sich eine Verschiebung der physiologischen Rhythmen, allerdings hin zu späteren Zeiten (Horne & Ostberg 1977; Czeisler et al. 1999; Duffy et al. 2001; Lack et al. 2009). Die große Mehrheit der Bevölkerung liegt dazwischen und wird dem Normaltyp zugeordnet. Insgesamt entspricht die Verteilung der Chronotypen in der Bevölkerung annähernd einer Gauß'schen Normalverteilung, bei der Morgen- und Abendtyp die Extreme darstellen (Roenneberg et al. 2007). Zu welchem Typ ein Mensch gehört, lässt sich mittels Fragebögen, wie zum Beispiel

dem Morningness-Eveningness Questionnaire nach Horne und Ostberg (1976), valide bestimmen. Genetisch betrachtet zeigen sich die auf Verhaltensebene und anhand physiologischer Abläufe festgestellten Unterschiede zwischen den Chronotypen als eine Verschiebung der Periodenlänge der circadianen Rhythmik in der Clock-Gen-Expression. So haben Personen vom Morgentyp eine verkürzte Periodenlänge, bei Abendtypen kommt es zu einer Verlängerung (Hasan et al. 2012).

### 1.3.3 Circadiane Rhythmusstörungen

Unter normalen Umständen erfolgt die Synchronisation der endogenen Rhythmik mit den externen Zeitgebern täglich neu. So ist eine Anpassungsfähigkeit gegenüber wechselnden sozialen und physischen Einflüssen möglich. Gelingt dies allerdings nicht ausreichend, kann es zu Störungen der Schlafrhythmik kommen (Barion & Zee 2007). Circadiane Rhythmusstörungen sind dadurch gekennzeichnet, dass ein Einschlafen und Aufstehen zu gewünschter Zeit kaum oder nicht möglich ist. Eine Störung der circadianen Rhythmik kann sich als ein zu langer oder zu kurzer Rhythmus präsentieren, als eine Unfähigkeit, einen stabilen Schlaf-Wach-Rhythmus beizubehalten, oder aber einer nicht gesellschaftskonformen Verschiebung der eigentlichen Aktivitäts- und Ruhezeiten (Barion & Zee 2007).

Im Fall von circadianen Schlafrhythmusstörungen würde sich ein stabiler Schlaf-Wach-Rhythmus mit normaler Schlafdauer einstellen, wenn das Individuum seinem inneren circadianen Rhythmus ohne Beeinflussung durch die Umwelt nachgehen könnte. Die Erholsamkeit des Schlafs wäre verbessert und Aktivität sowie Schläfrigkeit würden sich normalisieren. Die Qualität und die Quantität des Schlafs wären unter diesen Umständen nicht beeinträchtigt (Struck et al. 2013).

Die häufigsten externen Ursachen für circadiane Rhythmusstörungen stellen Schichtarbeit und chronischer Jet Lag dar. Durch die Notwendigkeit, entgegen der konventionellen Schlaf- und Aktivphasen zu agieren, kommt es bei einem Teil der Schichtarbeiter zu Schlaflosigkeit und ausgeprägter Müdigkeit während der Wachphasen. Diese Symptome halten auch Tage und zum Teil Wochen nach Ende der Schichtarbeit beziehungsweise des Zeitzonenwechsels bei Jet Lag, an (Barion & Zee 2007). Neben den äußeren Ursachen für circadiane Schlafrhythmusstörungen gibt es ebenfalls Formen, bei denen der endogene Rhythmus selbst als auslösend angesehen werden kann. Die häufigste Störung ist dabei das verzögerte Schlafphasensyndrom (Delayed Sleep-Phase Disorder [DSPD]), welches durch deutliche

Schwierigkeiten bis hin zum Unvermögen, zur gewünschten Zeit einschlafen zu können, imponiert. Zum Teil schlafen Betroffene erst am frühen Morgen ein. Aufgrund sozialer Normen ist die dann verbleibende restliche Schlafzeit verkürzt. Es resultiert ein Schlafdefizit einhergehend mit Müdigkeit am Tage, vor allem aber am Vormittag (Struck et al. 2013). Im Unterschied zum Vorliegen eines einfachen Abendtyps bestehen bei einer Schlafrhythmusstörung deutliche Beeinträchtigungen der Alltagsfunktion durch den Schlafmangel (Barion & Zee 2007). Mutationen in Clock-Genen scheinen circadiane Schlafrhythmusstörungen auslösen zu können (Nesbitt 2018). Insbesondere psychiatrische Erkrankungen sind mit einem verzögerten Schlafphasensyndrom vergesellschaftet (Nesbitt 2018). Neben affektiven Erkrankungen (Murray et al. 2017) ist vor allem auch eine Assoziation mit ADHS festzustellen (van der Heijden et al. 2005). Wie es auch bei ADHS zu beobachten ist, setzt die Melatoninsekretion bei verzögertem Schlafphasensyndrom verspätet ein (Bijlenga et al. 2013a). Die Vermutung liegt daher nahe, dass eine ähnliche Ätiologie für das Auftreten von ADHS und circadianen Schlafrhythmusstörungen verantwortlich ist. Besonderes Interesse liegt hierbei auf den der circadianen Regulation zugrundeliegenden genetischen Mechanismen, welche durch die Clock-Gene gesteuert werden. Auf diese Gruppe von Genen soll daher im folgenden Abschnitt näher eingegangen werden.

### 1.3.4 Clock-Gene

Bei der Suche nach den Ursachen für Störungen in der Chronobiologie liegt es nahe, sich mit der genetischen Grundlage der circadianen Rhythmik zu beschäftigen. Für die vielfältigen Tagesrhythmen ist ein Zusammenspiel verschiedener Gene verantwortlich, die sich gegenseitig regulieren. Es handelt sich dabei um einen zelleigenen Mechanismus, der aus einem Netzwerk von positiven und negativen Rückkopplungsschleifen besteht. Diese Rückkopplungsschleifen entstehen durch immer wieder nacheinander ablaufende molekulare Schritte. Dabei werden im Zellkern die sogenannten Clock-Gene transkribiert. Es entstehen mRNA-Produkte, die den Kern verlassen und ins Zytoplasma gelangen. Hier werden entsprechend der mRNA-Abfolge mit Hilfe von tRNA aus Aminosäuren Proteine zusammengesetzt. Diese Proteine verbinden sich untereinander, so entstehen Komplexe, welche wieder in den Zellkern gelangen und dort die Transkription hemmen oder auslösen, bevor sie wieder abgebaut werden und der Zyklus von neuem beginnen kann. Zu den Clock-Genen zählen unter anderem *CLOCK*, *CRY 1* und *2*, *BMAL1*, *PER 1*, *2* und *3*.

Die aus dem rhythmisch abgelesenen *BMAL1* und dem fortlaufend transkribierten *CLOCK* entstehenden Proteine verbinden sich zu einem Heterodimer. Dieses löst die Transkription von *CRY* und *PER* aus, indem es an regulatorische DNA-Sequenzen bindet. Entstandene CRY- und PER-Proteine wiederum bilden ebenfalls Heterodimere, welche an den Promotor von *BMAL1* und *CLOCK* binden und dadurch deren Transkription reduzieren. Nachfolgend kommt es durch diese negative Rückkopplung zur Hemmung der eigene Expression, wenn eine ausreichende Konzentration des CRY-PER-Komplexes erreicht ist (Forster & Kreitzman 2014; Ye et al. 2014). Zwischen diesen beiden Hauptschleifen kommt es durch Einfluss von Kernrezeptoren wie ROR  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  und REV-ERB  $\alpha$  und  $\beta$  zu einer zusätzlichen Stabilisierung des Rhythmus (Ueda et al. 2012; Foster & Kreitzman 2014). Abbildung 1 zeigt die beschriebenen Rückkopplungsschleifen schematisch dargestellt.

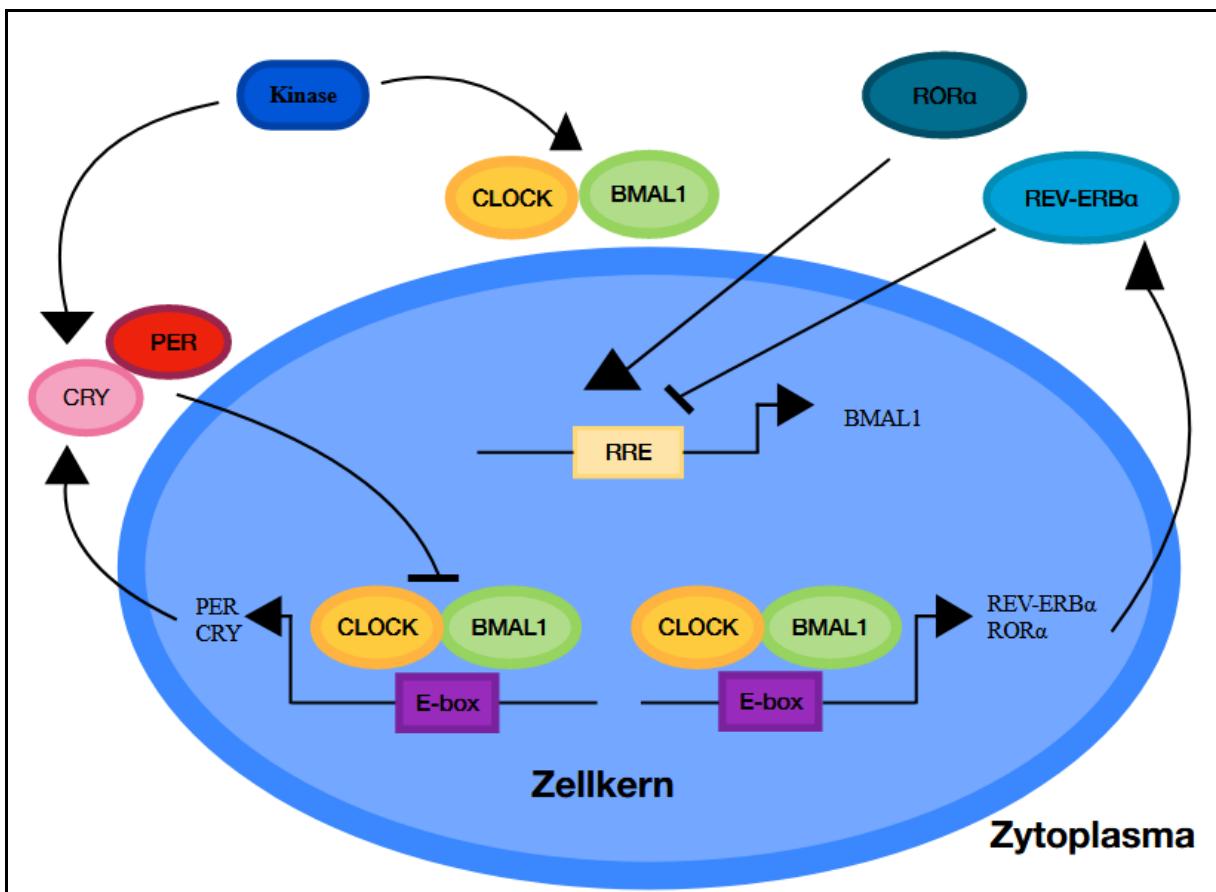


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Rückkopplungsschleifen der Clock-Gene (nach Marsi & Sassone-Corsi 2010).

Durch die rhythmische Transkription und Translation der einzelnen Clock-Gene kommt es zur Generierung eines ungefähr 24-stündigen Rhythmus‘ und zu einer Aktivierung nachgeschalteter Zielgene, die vielfältige Funktionen im Körper haben (Albrecht 2012). Kommt es zu Störungen in der Synthese der beteiligten Proteine, so ist eine Destabilisierung der circadianen Prozesse auf Zellebene zu verzeichnen (Bunger et al. 2000).

Eine besondere Rolle spielt hierbei der Hauptschrittmacher, der SCN. Die Zellen dieser Kernregion im Hypothalamus enthalten autonome Oszillatoren, in denen sich die Transkription der Clock-Gene periodisch abspielt und die durch eine komplexe Verbindung untereinander einen stabilen circadianen Rhythmus generieren, der taktgebend für alle weiteren peripheren Körperzellen ist (Mohawk et al. 2012). Untergeordnet sind auch in nahezu allen Körperzellen oszillierende Expressionen der Clock-Gene nachweisbar, deren Aktivität durch den Hauptschrittmacher synchronisiert wird (Yamazaki et al. 2000; Kowalska & Brown 2007).

Obwohl die beteiligten Gene in peripheren Zellen und im SCN die gleichen zu sein scheinen, gibt es Unterschiede zwischen zentralen und peripheren Oszillatoren. Im zentralen Schrittmacher scheint vor allem Licht für die Synchronisation verantwortlich zu sein und eine gewisse Unempfindlichkeit gegenüber weiteren Zeitgebern zu bestehen. Im Gegensatz dazu können Zeitgeber wie Nahrungsaufnahme, Temperatur und Glukokortikoide zu Phasenverschiebungen in peripheren Schrittmachern führen (Kowalska & Brown 2007). Wie lange ein Zyklus der Rückkopplungsschleifen dauert ist interindividuell unterschiedlich. Es resultieren dadurch verschieden lange Periodenlängen der circadianen Rhythmik, welche sich dann in Form von Aktivitäts- und Schlafpräferenzen zeigen, die uns die Zuordnung zu Chronotypen erlauben (Duffy et al. 2001). So haben Personen vom Morgentyp eine verkürzte Periodenlänge, bei Abendtypen kommt es zu einer Verlängerung (Hasan et al. 2012).

### **1.3.5 Bedeutung von Fibroblasten als In-vitro-Modell**

Um sich der genetischen Komponente der circadianen Rhythmik zu nähern, scheint es unerlässlich, die Expression einzelner Clock-Gene über einen längeren Zeitraum aufzuzeichnen, um so die tageszeitlichen Schwankungen zu erfassen. Um äußere Einflüsse dabei zu minimieren, sind möglichst konstante Umweltbedingungen wichtig (Klerman et al. 1996). Experimente mit Probanden, die sich unter konstanten Laborbedingungen aufhalten, sind jedoch aufwendig und schwer zu realisieren, sodass nach einem alternativen

Studieneinheit gesucht wurde. Hierzu wurden neben Tiermodellen auch in vitro Untersuchungen vorgenommen.

Da die involvierten Gene und der Ablauf des den Rhythmus bestimmenden Systems im SCN und in den peripheren Körperzellen sehr ähnlich sind, sind interindividuelle Unterschiede in der circadianen Rhythmik auch in den verschiedenen Zellen messbar, so auch in Bindegewebszellen wie den Fibroblasten (Schibler & Sassone-Corsi 2002; Welsh et al. 2004; Hasan et al. 2012). Hierbei handelt es sich um eine Zellart, die relativ unkompliziert kultiviert werden kann und große Teilungsraten aufweist (Takahashi 2001). Auch in Folgegenerationen sind die ursprünglichen circadianen Merkmale des Gewebes noch nachweisbar. Es kann jedoch im Rahmen der Mitose zu Phasenverschiebungen kommen (Nagoshi et al. 2004). Im Gegensatz zu in vivo gemessener circadianer Genexpression fehlt es den Fibroblasten in vitro an der Fähigkeit zur Synchronisation untereinander (Kowalska und Brown 2007). Durch externe Stimuli, wie der Gabe von Dexamethason, kann jedoch eine Synchronisation der Zellen erreicht werden, um Phasenverschiebungen der einzelnen Zellen zueinander auszugleichen (Balsalobre et al. 2000; Nagoshi et al. 2004).

Bei weiterführenden Untersuchungen an humanen Fibroblasten zeigte sich hierbei eine Korrelation der in vivo und in vitro gemessenen Periodenlängen (Brown et al. 2008; Pagani et al. 2010; Hida et al. 2013; Hida et al. 2017). Brown et al. (2005) entwickelten auf Grundlage dieser Forschungsergebnisse eine Methode, bei der mittels Lumineszenz-Rhythmus-Assay der circadiane Phänotyp dieser Zellart bestimmt werden kann. Die Fibroblasten werden durch Biopsie gewonnen. Nach Anzucht und Vermehrung wird ein Reporter-Gen namens *Bmal1::Luc*, bei dem es sich um ein Luciferase-Gen handelt, mit Hilfe von Lentiviren in die Zellen eingebracht. Die mittels real-time Biolumineszenz gemessene Aktivität der Luciferase wird durch den Promotor von *BMAL1* mitreguliert und spiegelt dessen Rhythmik wider. Hierbei korreliert die in vitro gemessene Periodenlänge mit der in vivo bestimmten Länge der Aktivitäts-Ruhe-Periodik (Brown et al. 2005). Weiterführend wurde der Zusammenhang zwischen der in vitro gemessenen Periodenlänge und dem Chronotyp des Individuums der entsprechenden Fibroblasten untersucht. Dabei wurde deutlich, dass es eine signifikante Korrelation zwischen Periodenlänge und Chronotyp gibt. So zeigten die Zellen von Menschen des Morgentyps kürzere Periodendauern ( $T = 24,33 \text{ h} \pm 0,41 \text{ h}$ ) als die des Abendtyps ( $T = 24,74 \text{ h} \pm 0,32 \text{ h}$ ). Am deutlichsten war dies bei extremen Periodenlängen feststellbar (Brown et al. 2008). Auch Pagani et al. (2010) fanden eine Proportionalität zwischen dem physiologischen Rhythmus eines Individuums, gemessen unter Laborbedingungen mit konstanten Umgebungsbedingungen, und der in vitro an Fibroblasten gemessenen Periodik.

Es kann damit angenommen werden, dass die Gewinnung und Kultivierung von humanen Fibroblasten geeignet ist, aufwendige und kostspielige Versuchsmodelle am gesamten Organismus zu ersetzen (Pagani et al. 2010). Der Vorteil von Fibroblasten als In-vitro-Modell ist zudem dadurch gegeben, dass sie leicht verfügbar durch wenig invasive Maßnahmen sind und die Anzucht verhältnismäßig wenig aufwendig ist. Aufgrund hoher Teilungsfähigkeit gelingt es aus kleinen Stanzbiopsien der Haut ausreichend viele Zellen zu gewinnen, um weiterführende Studien durchzuführen (Auburger et al. 2012).

### **1.3.6 Besonderheiten der circadianen Rhythmik bei ADHS**

Verschiebungen der circadianen Rhythmik stehen in Verbindung mit Schlafproblemen (Lack et al. 2008). Betrachtet man die hohe Anzahl an ADHS-Patienten mit Schlafproblemen, liegt der Verdacht nahe, dass Veränderungen in der circadianen Rhythmik mitverantwortlich hierfür sein könnten.

Insomnie spielt bei ADHS-Patienten eine große Rolle. Bis zu 80 % der Betroffenen berichten über ein erschwertes Einschlafen zu einem gewünschten Zeitpunkt. Häufig liegt also eine primäre Einschlafstörung (Sleep onset insomnia [SOI]) vor (Bijlenga et al. 2013a). Bei Patienten mit einer SOI zeigten sich in Studien Verzögerungen beim Einsetzen der Melatoninausschüttung im Dämmerlicht, sowie bei der Einschlaflatenz und der Aufwachzeit. Diese Veränderungen konnten auch bei ADHS Patienten nachgewiesen werden (Van der Heijden et al. 2005; Van Veen et al. 2010; Bijlenga et al. 2013a). Neben einer geringeren Amplitude der Melatonininkonzentration im Tagesverlauf zeigte sich auch bei der Sekretion von Cortisol eine zeitliche Verschiebung. So war bei ADHS-Patienten der Abstand zwischen Aufwachzeit und maximalem Cortisolspiegel verlängert (Baird et al. 2012). Zu diesem Ergebnis passend ist hinsichtlich der tageszeitlichen Präferenz bei Patienten mit ADHS häufiger das Vorliegen eines Abendtyps zu beobachten als bei Gesunden (Rybäk et al. 2007; Baird et al. 2012; Googan & McGowan 2017). Da Melatonin und Cortisol Biomarker der circadianen Rhythmik sind, kann eine verspätete Freisetzung dieser Hormone ein Hinweis auf eine Störung dieser Rhythmik in Form eines DSPD sein (Van der Heijden et al. 2005). Nach Untersuchungen von Bijlenga et al. (2013b) war eine Verschiebung der Schlafphasen und eine Verzögerung der Melatoninsekretion bei einer Vielzahl von ADHS-Patienten feststellbar, jedoch waren diese in ihrer Ausprägung nicht immer einem verzögerten Schlafphasensyndrom entsprechend. Tatsächlich ließ sich das Vorliegen eines DSPD jedoch

bei 26 % der ADHS-Patienten nachweisen (Bijlenga et al. 2013b). Auffallend ist, dass Patienten mit verzögerten Schlafphasen und späten Chronotypen eine stärkere Ausprägung der ADHS-Symptome aufwiesen (Coogan & McGowan 2017; Lunsford-Avery & Kollins 2018). Neben einer Verbesserung des DSPS bewirkte eine chronotherapeutische Gabe von niedrig dosiertem Melatonin auch eine Reduktion der ADHS-Symptomatik (Van Andel et al. 2021). Aus diesem Grund scheint eine weiterführende Untersuchung der circadianen Rhythmik bei ADHS-Patienten vielversprechend und wichtig.

Auch auf molekularer Ebene konnten Unterschiede zwischen an ADHS Erkrankten und Gesunden gezeigt werden. Baird et al. (2012) näherten sich der Frage nach der Expression der Clock-Gene über Analyse peripherer Oszillatoren in der Mundschleimhaut. In Schleimhautzellen von ADHS-Patienten scheint die Rhythmik der Expression von *PER2* und *BMAL1* gestört zu sein (Baird et al. 2012). Mutationen in weiteren Clock-Genen wurden ebenfalls mit dem Vorliegen von ADHS in Verbindung gebracht. So wurden Polymorphismen von *PER1* (Lasky-Su et al. 2008) und *PER2* (Brookes et al. 2006) gehäuft bei ADHS-Patienten gefunden. Ein Polymorphismus von *CLOCK* ist sowohl mit ADHS (Kissling et al. 2008) als auch mit dem Vorliegen eines Abendtyps assoziiert (Katzenberg et al. 1998).

### **1.3.7 Besonderheiten der circadianen Rhythmik unter Einsatz von ADHS-Medikation**

Das noradrenerge und das dopaminerige System im Gehirn haben einen großen Einfluss auf circadiane Prozesse. Da Atomoxetin und Methylphenidat durch Modulation von Konzentrationsverhältnissen dieser Transmitter arbeiten, haben beide Wirkstoffe Auswirkungen auf die circadiane Rhythmik, und das nicht nur bei ADHS-Patienten. So konnten zum Beispiel auch Studien an gesunden Versuchstieren Veränderungen der Aktivitätsverteilung im Tagesverlauf nach Gabe von Methylphenidat oder Atomoxetin zeigen. Zum einen führten Antle et al. (2012) ein Experiment mit gesunden Mäusen durch, bei dem Methylphenidat über das Trinkwasser gegeben wurde. Bei den gesunden Mäusen kam es durch das Medikament zu einer Aktivitätsverschiebung. Dabei war der Beginn der Aktivitätsphase deutlich verzögert. Mit fortschreitender Dauer des Experiments war auch die Phasenverschiebung stärker. Mit steigender Dosierung war außerdem die Periodenlänge zunehmend (Antle et al. 2012). Ebenfalls an Mäusen konnten O’Keeffe et al. (2012) eine Phasenverschiebung der circadianen Aktivitätsverteilung je nach Dosis und

Einnahmezeitpunkt feststellen. Zudem zeigte sich die Rhythmik nach Einnahme von Atomoxetin anfälliger für Photo-Stimuli (O'Keeffe et al. 2012).

Doch nicht nur auf Verhaltensebene konnten Auswirkungen der Medikamente auf die circadianen Abläufe nachgewiesen werden. Antle et al. (2012) konnten nach der Gabe von Methylphenidat eine erhöhte Amplitude der elektrischen Impulse direkt im SCN von gesunden Mäusen nachweisen. Dazu passend zeigten sich auch eine Phasenverschiebung und eine Abnahme der Variabilität der Rhythmik im SCN. Baird et al. (2013) kamen zu dem Ergebnis, dass nicht alle Clock-Gene gleichermaßen durch Methylphenidat und Atomoxetin beeinflusst werden. Es scheint vielmehr so zu sein, dass Methylphenidat und Atomoxetin in verschiedenen Gehirnregionen unterschiedliche Auswirkungen auf die einzelnen Clock-Gene haben. Durch den Nachweis von Veränderungen in der Expression einzelner Clock-Gene im SCN und anderen zentralen Hirnregionen kann angenommen werden, dass sich die Gabe von Atomoxetin und Methylphenidat direkt auf den Hauptschrittmacher der circadianen Rhythmik auswirkt. Dadurch werden vermutlich auch alle nachgeschalteten zentralen und peripheren Rhythmen beeinflusst, da die Gene essentiell für die Aufrechterhaltung der entscheidenden Rückkopplungsschleifen und damit für die Generierung der Rhythmik verantwortlich sind. Das kann, unter anderem durch veränderte Ausschüttungsmuster von Hormonen wie Melatonin und Cortisol, Einfluss auf das Verhalten der Probanden haben und deren circadiane Präferenzen modulieren (Baird et al. 2013).

## **1.4 Fragestellung/Hypothese**

In meiner Arbeit möchte ich mich näher mit dem circadianen Rhythmus von erwachsenen ADHS Patienten beschäftigen. Da eine Vielzahl der Patienten unter Schlafstörungen leidet, kann vermutet werden, dass eine Veränderung im endogenen Rhythmus der Patienten hierfür verantwortlich ist. Da der am deutlichsten sichtbare, und damit am einfachsten *in vivo* messbare circadiane Rhythmus die Schlaf- und Wachzeit betrifft, erfolgte dessen Beurteilung und Auswertung im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit. Um sich andererseits auch auf genetischer Ebene dem Thema zu nähern, wurde ein Versuchsmodell angewandt, bei dem humane dermale Fibroblasten der Studienteilnehmer gewonnen und kultiviert wurden. Diese zeigten einen endogenen Rhythmus der Genexpression, der repräsentativ für das Ursprungsindividuum anzusehen ist. Mit Hilfe der Fibroblasten können durch moderne Verfahren die Verläufe der Clock-Gene aufgezeichnet und analysiert werden. Mit Hilfe des Versuchsaufbaus sollen folgende Hypothesen untersucht werden:

1. Patienten mit ADHS zeigen eine veränderte circadiane Rhythmik im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen.
2. Anhand der von ADHS-Patienten gewonnenen Fibroblasten lassen sich periodische Verläufe der Genexpression ableiten.
3. Die Expression einzelner Clock-Gene ist bei den ADHS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen verändert.

Durch zusätzliche Unterteilung des Patientenkollektivs in Gruppen mit und ohne ADHS-Medikation ist zu erwarten, dass sich zusätzliche Informationen über die Auswirkung dieser Medikamente auf die circadiane Rhythmik der Patienten gewinnen lassen. Mit den gewonnenen Daten ist eine Erweiterung der bestehenden Kenntnisse zur circadianen Rhythmik von ADHS-Patienten zu erhoffen, die einer optimierten Therapie der ADHS-Erkrankung dienen und eventuell neue Therapiemöglichkeiten eröffnen kann.

## **2 Probanden und Methodik**

### **2.1 Probanden**

#### **2.1.1 Studiendesign**

Bei der Studie handelt es sich um eine sequentielle, kontrollierte, nicht randomisierte, offene (Laboranalysen verblindet), quasi-experimentelle Studie (Dreigruppen-Design: ADHS mit beziehungsweise ohne Medikamente gegenüber Kontrollen). Um die Gruppen vergleichbar zu machen, wurden die Kontrollprobanden so gewählt, dass sie den Teilnehmern der Patientengruppe hinsichtlich Alter, IQ und Geschlecht ähnlich waren. Geplant wurde sie als initiale Pilotstudie, wobei ein naturalistisches, nicht hoch selektiertes Patientenkollektiv untersucht wurde. Die Durchführung der Studie wurde durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Rostock geprüft und genehmigt.

#### **2.1.2 Probandenkollektiv**

Die Studententeilnehmer der Patientengruppe sind alle Patienten der psychiatrischen Institutsambulanz der Universitätsmedizin Rostock, bei denen im Vorfeld ADHS durch erfahrene Psychiater diagnostiziert wurde. Über Aushänge oder direktes Kontaktieren der Patienten wurden die Probanden auf die Studie aufmerksam gemacht. Die Kontrollpersonen wurden aus dem eigenen Bekanntenkreis und aus den Reihen der Mitarbeiter der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie rekrutiert. Um mögliche störende Einflussfaktoren zu minimieren, wurden im Vorfeld der Studie Ein- und Ausschlusskriterien festgelegt. Eingeschlossen wurden volljährige, einwilligungsfähige Patienten, deren Komorbiditäten in ihrer symptomatischen Ausprägung den ADHS-Symptomen nicht überlegen waren. Als Kontrollpersonen ausgeschlossen waren Personen, bei denen klinisch der Verdacht einer ADHS vorlag oder die den Cut-off Wert im WHO-Screener oder WURS-k erreichten. Eine Tätigkeit im Schichtsystem führte ebenfalls zum Ausschluss, da dies zur Desynchronisation des circadianen Rhythmus führen kann (Monk et al. 2013). Freiwillige, die aufgrund sprachlicher Probleme oder sonstiger Einschränkungen nicht ausreichend fähig waren, den Zusammenhang-sowie die Tragweite der Untersuchungen zu verstehen und die Fragebögen selbstständig auszufüllen, mussten ebenfalls aus der Studie ausgeschlossen werden.

### **2.1.3 Gruppeneinteilung**

Die Einteilung der Gruppen erfolgte anhand der im Vorfeld gestellten Diagnose einer ADHS. Innerhalb des Patientenkollektivs erfolgte erneut eine Unterteilung in eine Gruppe mit ADHS-Medikation und in eine Gruppe ohne medikamentöse ADHS-Therapie. Hierbei wurde unterschieden, ob eine Psychopharmakotherapie mit den zur Behandlung der ADHS zugelassenen Substanzen Methylphenidat und Atomoxetin durchgeführt wurde oder nicht. Somit sind alle Patienten, die keines dieser beiden Medikamente erhielten in die Gruppe der Patienten ohne ADHS-Medikation eingeteilt worden. Es erfolgte dabei keine weitere Unterscheidung bezüglich der Dosierung und auch nicht bezüglich der Einnahmedauer, um ein möglichst naturalistisches Patientenkollektiv zu erhalten.

### **2.1.4 Zeitlicher Ablauf**

Während eines Erstgesprächs wurden alle Probanden über den Ablauf der Studie informiert und über den Nutzen und die Risiken aufgeklärt. Zudem wurde ihnen eine Probandeninformation in schriftlicher Form ausgehändigt. Diese enthielt zusammengefasst die Ziele und den Ablauf, sowie Informationen zum Datenschutz der Studie. Die schriftliche Einverständniserklärung wurde unterzeichnet, nachdem den Probanden ihre Fragen in Bezug auf die Studie ausführlich beantwortet wurden. Die Teilnahme war freiwillig und es bestand zu jeder Zeit die Möglichkeit zum Abbruch.

Nach Aufklärung und Einwilligung zur Teilnahme erfolgten die Bearbeitung der Fragebögen und das strukturierte Interview, was insgesamt zwischen 60 und 90 Minuten dauerte. Im Anschluss wurde die Actiwatch ausgehändigt und eine kurze Gebrauchsanweisung folgte. Ein weiterer Termin wurde im Abstand von einer Woche geplant. Beim zweiten Treffen gaben die Teilnehmer die Actiwatch zurück, damit diese im Anschluss ausgelesen werden konnte. Außerdem wurde die Hautbiopsie während dieses Termins durchgeführt. Die Fibroblasten stammen aus dem Hautgewebe der Innenseite des Oberarms des jeweiligen Probanden. Hierzu wurde zunächst ein Lidocain-Pflaster (Emla-Pflaster, AstraZeneca, Wedel, Deutschland) für eine Stunde aufgeklebt, um die entsprechende Hautstelle zu betäuben. Nach gründlicher Desinfektion wurde mittels Einweg-Hautstanze (Stiefel, Offenbach, Deutschland), deren Durchmesser 2 mm betrug, ein ca. 5–7 mm langer Hautzylinder entnommen. Wegen des geringen Durchmessers des Hautdefektes und der geringen Zugspannung an der Oberarminnenseite war ein Vernähen der Wundränder nicht erforderlich.

Es erfolgte stattdessen eine Versorgung mit Omnistrips (Hartmann, Heidenheim, Deutschland), welche für sieben Tage auf der Wunde zu verbleiben hatten und zusätzlich mit einem sterilen Pflaster abgedeckt wurden. Das zweite Treffen dauerte 90 Minuten. Für die Probanden war nach diesem Treffen die Mitarbeit an der Studie beendet. Bei Fragen oder Problemen seitens der Teilnehmenden war telefonischer Kontakt jederzeit möglich.

## 2.2 Methodik

### 2.2.1 Testpsychologie

Einen Arbeitsschritt der Studie stellten Fragebögen und ein strukturiertes Interview dar, deren Durchführung am ersten Studentag erfolgte. Dabei wurden die folgenden, klinisch etablierten Instrumente verwendet:

#### 1. WURS-k

Die Kurzform der Wender Utah Rating Scale (WURS-k) dient im Rahmen der ADHS-Diagnostik bei Erwachsenen der retrospektiven Erfassung von Krankheitssymptomen im Alter von 8–10 Jahren. Dieses Selbstbeurteilungsverfahren besteht aus 25 Items, für die der Patient selbst eine Schweregradeinstufung vornehmen soll. Zur Auswahl stehen hierbei die Möglichkeiten 0 = *trifft nicht zu*, 1 = *gering ausgeprägt*, 2 = *mäßig ausgeprägt*, 3 = *deutlich ausgeprägt* und 4 = *stark ausgeprägt*. Bei vier dieser Items handelt es sich um Kontrollitems, die nicht in die Summe einfließen, sondern zur Beurteilung motivationaler Aspekte dienen. Die maximal erreichbare Punktzahl liegt bei 84 Punkten, wobei ein Überschreiten von 30 Punkten dafürspricht, dass ein Vorhandensein von ADHS in der Kindheit wahrscheinlich ist (Retz-Junginger et al. 2002).

#### 2. D-MEQ

Der D-MEQ stellt einen Fragebogen zur Bestimmung des Chronotyps dar. Es handelt sich hierbei um die deutsche Version des 1976 von Horne und Östberg erstellten Fragebogens MEQ, der aus 19 Fragen zum Schlafverhalten und zur Leistungsfähigkeit im Tagesverlauf besteht. Er gibt Aufschluss über das subjektive circadiane Verhalten. Den Antworten werden Ziffern zugeordnet, aus denen sich dann in der Summe die Gesamtpunktzahl ergibt, nach der der Chronotyp bestimmt wird. Bei einer Punktzahl von 14–30 Punkten liegt ein definitiver Abendtyp vor, bei 31–41 Punkten ein moderater Abendtyp. Werte von 42–58 werden als Normaltyp gewertet. Erzielt ein Proband 59–69 Punkte wird er dem moderaten Morgentyp zugeordnet. Bei Überschreiten von 70 Punkten bis zur maximalen Punktzahl von 86 Punkten liegt ein definitiver Morgentyp vor (Horne & Ostberg 1976).

#### 3. MWT-B

Der Mehrfachwahl-Wortschatz-Intelligenztest dient der groben Abschätzung der allgemeinen Intelligenz, besonders jedoch der kristallinen Intelligenz. Der Test besteht aus insgesamt 37

Items mit aufsteigender Schwierigkeit. Bei jedem Item handelt es sich um eine Reihe aus fünf Wörtern, wobei eines ein wirklich existierendes Wort ist und die anderen vier fiktive Konstruktionen aus Silben. Zur Auswertung wird die Anzahl der richtig gelösten Items einem IQ-Wert zugeordnet (Merz et al. 1975).

#### 4. IDA

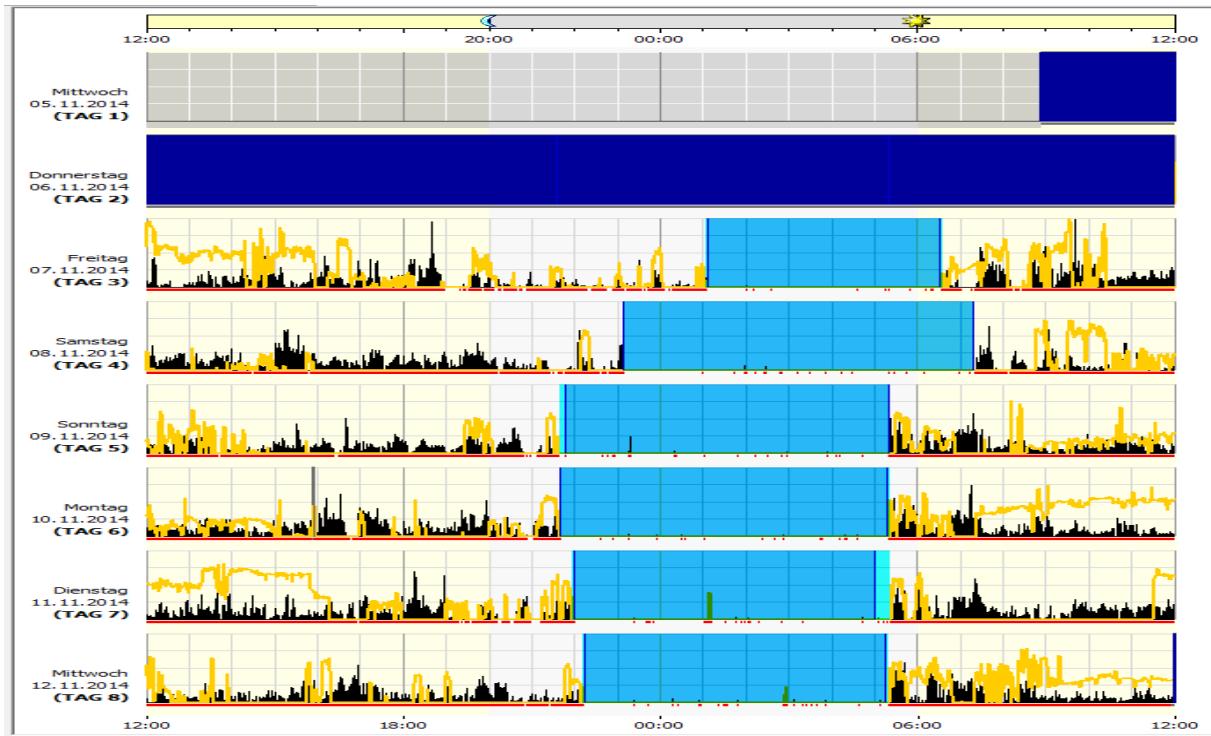
Hierbei handelt es sich um ein Instrument, dass die Diagnosestellung der ADHS im Erwachsenenalter erleichtern soll. Der Inhalt bezieht sich dabei auf die Diagnosekriterien von DSM-4 und ICD-10 (Retz et al. 2013). Den ersten Teil stellt hierbei der WHO Screener (ASRS V1.1) dar (Kessler et al. 2005b). Besteht nach Beantwortung der sechs Fragen im Screening der Verdacht auf das Vorliegen einer ADHS, schließt sich ein Interview an. Hierbei zielen die weiteren Fragen einerseits auf das Verhalten in der Kindheit und andererseits auf Verhaltensweisen und ADHS-Symptome in den letzten sechs Monaten vor Bearbeitung des Fragebogens ab. Zur aktuellen Symptomatik sind dabei je neun Fragen zu Kriterien von Aufmerksamkeitsstörungen und zu Hyperaktivität zu beantworten, wobei zwischen den Antwortmöglichkeiten *nicht vorhanden/nie*, *leicht ausgeprägt/manchmal* und *stark ausgeprägt/häufig* zu entscheiden ist. Am Ende werden alle mit *stark ausgeprägt/häufig* beantworteten Fragen je Symptomkomplex zusammengezählt. Wird dabei mindestens sechsmal die maximale Ausprägung für Hyperaktivität oder Aufmerksamkeitsstörungen angegeben, spricht dies für das Vorliegen einer ADHS.

Im Rahmen dieser Studie wurde die Bearbeitung des Fragebogens bei allen Probanden weiter fortgeführt, auch wenn sich im Screening-Abschnitt kein Hinweis auf ADHS zeigte. Genutzt wurde das strukturierte Interview vor allem, um einen Eindruck über die Symptomschwere der Erkrankung in der Zeit unmittelbar vor der Studienteilnahme zu erhalten. Die Fragen zu Aufmerksamkeitsstörungen und Hyperaktivität wurden unverändert gestellt, jedoch erfolgte die Auswertung in abgewandelter Form. Den Antwortoptionen des strukturierten Interviews wurden Punktewerte zugeordnet: *nicht vorhanden/nie* = 0 Punkte, *leicht ausgeprägt/manchmal* = 1 Punkt und *stark ausgeprägt/häufig* = 2 Punkte. Für die Symptomkomplexe *Aufmerksamkeitsstörungen* und *Hyperaktivität – Impulsivität* ergab sich so beim Addieren jeweils ein Maximalwert von 18 Punkten, zusammengenommen maximal 36 Punkte. Anhand der Verteilung der Punktewerte wurde so eine Aussage über die Symptomschwere der ADHS der einzelnen Probanden zum Zeitpunkt der Studienteilnahme möglich.

## **2.2.2 Aktigraphie**

Um neben der durch Selbsteinschätzung gewonnenen Zuteilung des Chronotyps durch die Fragebögen auch einen objektiven Eindruck über das Verhalten im Tagesverlauf zu erhalten, erfolgte der Einsatz von Aktigraphie. Das dabei genutzte Messgerät wird Actiwatch genannt. Dieses Armbanduhr-ähnliche Gerät besitzt einen dreidimensionalen Beschleunigungssensor, mit dem Bewegungen aufgezeichnet werden, sowie einen Lichtsensor, über den die Lichtbeziehungsweise Beleuchtungsverhältnisse erfasst werden. So lässt sich die körperliche Aktivität ermitteln, aus der die Schlaf- und Wachphasen des Probanden rekonstruiert werden können. Länger andauernde Immobilität wird dabei als Schlaf gewertet. Das Material der Actiwatch ist wasserdicht, wodurch sie auch zum Duschen nicht abgenommen werden muss. Eine kontinuierliche Messung ist somit im gewohnten Umfeld des Probanden ohne großen Aufwand möglich.

Im Rahmen dieser Studie wurde die Respirationics Actiwatch 2 (Philips Respirationics, Pennsylvania, USA) genutzt. Die Probanden waren angehalten, das Gerät über einen Zeitraum von sieben aufeinanderfolgenden Tagen durchgehend am Handgelenk der nicht-dominanten Hand zu tragen. In die Auswertung eingeschlossen wurden schließlich die Daten von sechs aufeinanderfolgenden Tagen von Mitternacht bis Mitternacht, wobei sichergestellt wurde, dass jeweils ein zusammenhängendes Wochenende mit eingeschlossen war. Für die Dauer des Tragens wurde ein Aufzeichnungsabstand von 60 Sekunden festgelegt. Mithilfe der dazugehörigen Computer-Software Respirationics Actiware 5.57 (Philips Respirationics, Pennsylvania, USA) wurden aus den gemessenen Daten von Bewegungen und Belichtung die Tag- und Nachtphasen rekonstruiert, wie es in Abbildung 2 beispielhaft dargestellt ist. Als Grenzwert zur Unterscheidung zwischen Schlaf- und Wachperioden wurden 40 Aktivitätspunkte pro Stunde festgelegt, um das tatsächliche Aktivitätsprofil möglichst genau abzubilden (Kushida et al. 2001). Gemessen wurden neben der Zeit des Einschlafens und Erwachens auch die totale Schlafzeit, die Aktivität während der Schlafperiode, die Anzahl nächtlichen Erwachsens und die Schlafeffektivität.



*Abbildung 2:* Beispielhafter Auszug aus der Software Respiration Actiware 5.57 eines Probanden. Dargestellt sind die einzelnen Wochentage mit Datum und Uhrzeit. Dunkelblaue Bereiche stellen nicht in die Auswertung eingegangene Zeitabschnitte dar. Hellblau markierte Bereiche kennzeichnen den Schlaf. Gelb dargestellt ist die Belichtungssituation zur jeweiligen Zeit, schwarze Balken entsprechen dem Ausmaß der Aktivität zum jeweiligen Zeitpunkt. Die rote Linie unterhalb der einzelnen Zeilen gibt an, ob Aktivität stattgefunden hat. Entsprechend werden Zeitspannen mit nahezu durchgezogener Linie als Wachphasen und Zeitabschnitte mit nur vereinzelt auftretender Aktivität als Schlaf gewertet.

### **2.2.3 Kultivierung der Fibroblasten**

Aus dem entnommenen Hautstück wurden zunächst die Fibroblasten gewonnen und anschließend kultiviert. Hierfür wurde ein von Takashima (2001) etabliertes Protokoll genutzt. Dabei wurden zunächst die Fibroblasten aus dem Hautstück isoliert, indem eine enzymatische Spaltung in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM [Gibco, Thermo Fisher, Massachusetts, USA]) mit 1 mg/ml Liberase TM (Roche, Penzberg, Deutschland) erfolgte. Die gewonnenen Fibroblasten wurden anschließend unter sterilen Bedingungen auf einem Medium bestehend aus DMEM, 10 % fetales Kälberserum (FBS [Gibco, Thermo Fisher, Massachusetts, USA]), 100 U/ml Penicillin (Gibco, Thermo Fisher, Massachusetts, USA) und 100 µg/ml Streptomycin (Gibco, Thermo Fisher, Massachusetts, USA) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. In 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen wurden die Fibroblasten unter standardisierten Bedingungen verwahrt, um nachfolgende Untersuchungen durchzuführen.

## 2.2.4 Real-Time PCR

Um Informationen über den circadianen Rhythmus der Zellen zu gewinnen, wurden zwei verschiedene Methoden genutzt. Es erfolgte eine quantitative Real-Time PCR, wobei das Gerät CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (BIO RAD, Hercules, USA) verwendet wurde, um die Messung der vorliegenden Genprodukte von *BMAL1*, *BMAL2*, *CLOCK*, *CRY1*, *PER1*, *PER2* und *PER3* zur jeweiligen Zeit nach Synchronisation durchzuführen. In Vorbereitung dazu wurden pro Proband je sieben Mediumflaschen mit den entsprechenden Fibroblasten beimpft. Nach erfolgter Synchronisation der circadianen Aktivitäten der Zellen durch Zugabe von Dexamethason (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) für 30 Minuten wurden die Zellkulturen nach 15 Minuten sowie nach 4 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h und 24 h mit PBS (Gibco, Thermo Fisher, Massachusetts, USA) gespült und die Zellen in Solution D (Gibco, Thermo Fisher, Massachusetts, USA) aufgefangen, welches aus 0,1 mol/l  $\beta$ -Mercaptoethanol, 25 mmol/l Natriumcitrat, 4,5 mol/l Guanidiniumthiocyanat und 0,5 % Natrium-Laurylsarcosin bestand.

Die Isolierung der RNA erfolgte mittels RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Californien, USA). Um hieraus cDNA zu gewinnen, wurde das SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Thermo Fisher, Massachusetts, USA) eingesetzt und die DNA-Polymerase enthaltende Fertiglösung KAPA SYBR Green Master Mix (Kappa Biosystems, Darmstadt, Deutschland) dazugegeben sowie für jedes zu untersuchende Gen 200 nmol/l der entsprechenden Primer-Mischung (Eurofins, Alameda, USA) und 20 ng DNA-Matrizen. Zur Berechnung der Wirksamkeit der Primer wurde das Programm LinRegPCR v 11.0 (Heart Failure Research Center, Amsterdam, Niederlande) verwendet und die  $\Delta\Delta Ct$ -Methode (Livak & Schmittgen 2001) genutzt, wobei als Referenzwert jeweils der individuelle Durchschnittswert des Gens diente. Die dabei ermittelten Werte der Wirksamkeit lagen zwischen 1,78 und 2,00. Die verwendeten Primer-Sequenzen sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Die gemessenen Expressionswerte wurden mit der durchschnittlichen Expression von Housekeeping Genen der jeweiligen Probe korrigiert. Hierzu wurden die ribosomalen Proteine 13a RPL13a, 17a RPL17a und GAPDH verwendet, die den Merkmalen stabiler Housekeeping Gene von Mane et al. (2008) entsprechen. Durch zeitliches Auftragen der Messwerte zum jeweiligen Zeitpunkt nach Synchronisation wurde so eine Kurve generiert, die Aussagen über die circadiane Expression des entsprechenden Gens zulässt.

Tabelle 1: Verwendete Primer-Sequenzen je Gen.

<b>Gen</b>	<b>Vorwärtsprimer</b>	<b>Rückwärtsprimer</b>
<i>CLOCK</i>	CCAGCAGTTCATGAGATGC	GAGGTCAATTCTAGCTGAGC
<i>BMAL1</i>	AAGGATGGCTGTTCAGCACATGA	CAAAAATCCATCTGCTGCCCTG
<i>PER1</i>	TGGGGAGAACAGAACAGAGAA	AGGACACTCCTGCGACCA
<i>PER2</i>	GTATCCATTGATGCTGGCT	TCGTTGAAC TGCGGTGAC
<i>PER3</i>	TCAGTGTGGAAGGAA	TCTGGTCAGCAGCTCTACA
<i>CRY1</i>	CACGAATCACAAACAGACGG	TACATCCTGGACCCCTGGT
<i>RPL13a</i>	GCCAGAAATGTTGATGCCTT	AGATGGCGGAGGTGCAG
<i>RPL17a</i>	GCCCATCTTGATGAGCTTC	GTGGCAAGAAGAAGGTCTGG
<i>GAPDH</i>	GAAGGTGAAGGTCGGAGT	GAAGATGGTGATGGGATTTC

## 2.2.5 Biolumineszenz

Neben der Real-Time PCR wurde im Rahmen der Studie ein weiteres Verfahren eingesetzt. Hierbei erfolgte eine kontinuierliche Messung der Aktivität von *BMAL1*. Der Teil des Experiments wurde im Zellkulturlabor des Center of Brain, Behavior, Metabolism in Lübeck durchgeführt. Mit Hilfe des lentiviralen Vektors pLV6\_BmLuc wurde dort das Luciferase-Gen *Bmal1::Luc* in die Zellkerne der Fibroblasten eingebracht, wo es stabil in das zelleigene Genom in der Nähe des *BMAL1*-Promotors eingebaut wurde. Durch Übertragung des Gens erhält der Fibroblast die Fähigkeit zur Biolumineszenz. Im Rahmen der normalen circadianen Genexpression erfolgte nach Transduktion in Abhängigkeit von der *BMAL1*-Aktivität auch die Expression des Luciferase-Gens. Die Leuchtaktivität ist durch die Abhängigkeit der beiden genannten Gene voneinander somit proportional zur Expression von *BMAL1*. Die resultierende Schwankung der Biolumineszenz wurde in dieser Studie mit Hilfe des Geräts Berthold TriStar LB 941 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland), welches in Abbildung 3 zu sehen ist, gemessen.



Abbildung 3: Foto des Berthold TriStar LB 941 im Zellkulturlabor des Center of Brain, Behavior, Metabolism in Lübeck.

Aus der Kontrollgruppe wurden sieben, und aus den Patientengruppen je sechs Fibroblastenkulturen zufällig ausgewählt, um die nächsten Schritte durchzuführen und die *BMAL1*-Aktivität kontinuierlich aufzuzeichnen. Zunächst wurde ein Anwachsen auf eine ausreichende Zellzahl abgewartet. Um die Transfektion durchzuführen wurden mindestens  $2,5 \times 10^4$  Zellen auf eine 96 Mikrotiterplatte (Applied Biosystems, Thermo Fisher, Massachusetts, USA) aufgetragen und 100 µl Kulturmedium, bestehend aus DMEM, 20 % FBS und 1/100 Antibiotika, dazugegeben und kultiviert. Um eine ausreichende Zellzahl zu erhalten, wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend, nach Zugabe von 1 ml des Enzyms Trypsin in EDTA, für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach vorsichtigem Durchmischen wurde die Zelllösung in ein Zentrifugenröhrchen überführt und nochmals 1–2 ml Medium hinzugefügt. Nach Zentrifugation für 5–10 Minuten bei einer RZB von 500–1000 x g sammelten sich die Zellen der Lösung am Boden. Der Überstand konnte dann mittels Pipette abgesaugt werden. Übrig blieb das zellreiche Pellet am Boden des Zentrifugenröhrchens. Dieses Pellet wurde mit 1 ml Kulturmedium versetzt. Nun wurden je 50 µl Zellsuspension und Trypanblau-Lösung vermischt und anschließend 10–50 µl des Gemischs in ein Hämacytometer überführt, um die Zellzahl zu bestimmen. Ausgezählt werden sollten dabei nur lebende, nicht blau gefärbte Zellen. Bei einer Zellzahl von  $2,5 \times 10^4$  erfolgte die Zugabe von 100 µl Kulturmedium und die Inkubation über Nacht bei 37 °C. Am Folgetag wurden die Platten erneut mit PBS gewaschen. 500 µl Medium wurden mit 0,5 µl Polybrene (Hexadimethrinbromid) versetzt und anschließend je 100 µl in jede Vertiefung gegeben. Als nächstes wurden 10 µl Virus pLV6\_BmLuc (Sirion Biotech, Martinsried, Deutschland) jeder Vertiefung hinzugefügt und gut gemischt. Für 18–20 Stunden wurden die mit dem Virus vermischten Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte erneutes Abspülen mit PBS sowie ein Mediumwechsel. Ab 48 Stunden nach der Transfektion konnten Experimente erfolgen.

Um eine kontinuierliche Überwachung der Aktivität der Luciferase vornehmen zu können, mussten die circadianen Vorgänge in den Zellen synchronisiert werden. Hierzu wurde den Zellen 100 µl Synchronisationsmedium zugeführt. Hierbei handelt es sich um eine Mischung aus DMEM, 5 % FBS sowie 1 mM Dexamethason. Nach dessen Zugabe war eine erneute Inkubation von 2 Stunden abzuwarten. Für die Experimente war schließlich ein gesondertes Aufzeichnungsmedium nötig, wobei es sich um ein Gemisch mit einem pH von 7,6 handelte, das aus DMEM ohne Phenolrot (Life Technologies, Kalifornien, USA), 5 % FBS und 15 mM HEPES Puffersubstanz (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) bestand und welches ebenfalls bei 37 °C gehalten werden sollte. Nach zweistündiger Synchronisation wurde dem

Aufzeichnungsmedium 100 µM D-Luciferin (Promega, Mannheim, Deutschland), was 40 µl entspricht, hinzugefügt und das Synchronisationsmedium durch 100 µl des vorbereiteten Aufzeichnungsmediums auf der Mikrotiterplatte ersetzt. Diese wurde anschließend gasdurchlässig versiegelt, um sterile Bedingungen zu schaffen. Die Platte wurde dann in das Gerät Berthold TriStar LB 941 eingesetzt. Bei einer Temperatur von 34 °C wurde dann die Lumineszenz für 96 Stunden bestimmt.

## 2.2.6 Statistische Auswertung

Bei der Analyse chronobiologischer Prozesse werden Schwankungen der Ausprägung bestimmter Merkmale im zeitlichen Verlauf untersucht. Aus den dabei gewonnenen Daten kann eine Cosinor-Funktion berechnet werden. Hierbei ergeben sich verschiedene Parameter, die für weitere Analysen genutzt werden können (Abbildung 4). Die Periodenlänge gibt dabei an, nach welcher Zeit sich ein Vorgang beziehungsweise ein Merkmal in seiner Ausprägung wiederholt. Der MESOR gibt den Mittelwert an, um den die rhythmische Periodik oszilliert. Während die Akrophase die Zeit beschreibt, nach der der Peak des Rhythmus erreicht ist, gibt die Amplitude die Differenz zwischen mittlerer und maximaler Ausprägung des Kurvenverlaufs an (Cornelissen 2014). Diese Parameter wurden in Abbildung 4 an einem beispielhaften Graphen verbildlicht.

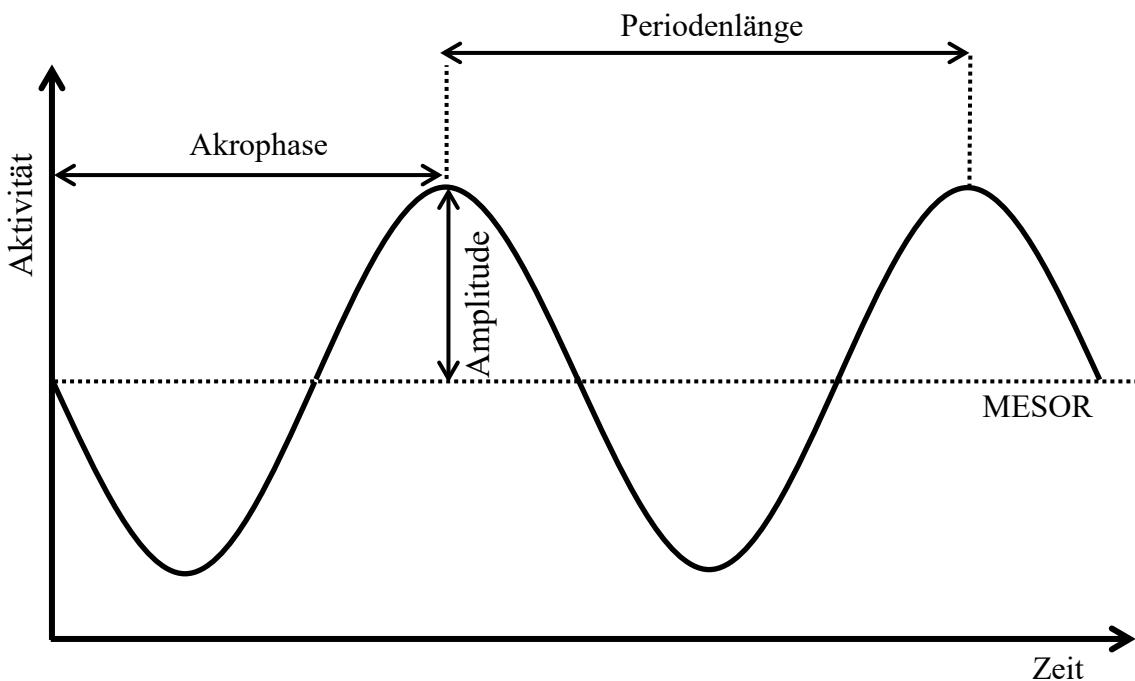


Abbildung 4: Kenngrößen bei der Analyse von Cosinor-Funktionen.

Hinsichtlich der Aktigraphie erfolgte die nicht-parametrische Analyse mehrerer Kennwerte. Zum einen wurde die Variabilität von Ruhe und Aktivität innerhalb eines Tages (Intradaily Variability = IV) bestimmt. Bei einer hohen IV zeigt sich eine Fragmentierung des Rhythmus, welcher zum Beispiel durch nächtliche Wachphasen zustande kommen kann, wie auch durch Schlafphasen im Tagesverlauf. Die Schlafqualität ist bei hoher IV als vermindert anzusehen, auch negative Einflüsse auf die kognitiven Funktionen resultieren. Des Weiteren wurde die Stabilität der circadianen Rhythmisik im Vergleich zwischen den einzelnen Tagen (Interdaily Stability [IS]) bestimmt. Je besser die Synchronisation an äußere Zeitgeber erfolgt, desto höher ist die IS: es zeigt sich also ein stabiler Rhythmus. Insgesamt wird eine hohe IS mit guter kognitiver Funktion und guter Schlafqualität in Verbindung gebracht, auch zu nächtlicher Aktivität kommt es seltener als bei instabiler Rhythmisik (Gonçalves et al. 2014). Die relative Amplitude (RA) der Aktivität im Tagesverlauf und die Gesamtzeit der nächtlichen Wachphasen nach Einsetzen des Schlafs (Wakening after Sleep Onset [WASO]), wurden analysiert. Außerdem wurden nächtliche Wachphasen nach Anzahl und Dauer der einzelnen Episoden untersucht. Schließlich wurde auch die durchschnittliche motorische Aktivität während der Periode der zehn aktivsten Stunden (M10), welche die Aktivität des Tages repräsentiert, und der Periode der fünf motorisch am inaktivsten Stunden (L5), welche die nächtliche Aktivität widerspiegeln, ermittelt. Dabei ergibt sich aus der Differenz von M10 und L5 die RA der motorischen Aktivität. Tabelle 2 bietet einen Überblick der Kenngrößen der aktigraphischen Auswertung mit deren Erklärungen.

Zur Berechnung der aktigraphischen Kenngrößen wurden die Rohdaten der Respiromics-Software in eine SPSS Datei importiert und entsprechende Werte für die einzelnen Gruppen berechnet. Um Aussagen über signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten zu treffen, erfolgte die Varianzanalyse mittels MANCOVA, wobei Alter, Geschlecht und Symptomschwere der ADHS als Co-Variablen berücksichtigt wurden. Um letztendlich herauszufinden, welche Gruppen gegeneinander tatsächlich signifikante Unterschiede aufwiesen, wurde ein Post-Hoc-Test (Gabriel Test) durchgeführt und mittels Bonferroni korrigiert.

Um mit den durch Real-Time PCR und Biolumineszenzmessung gewonnenen Daten weitere Analysen durchzuführen, wurde zunächst mittels CircWave v. 1.4 (generated by Dr Roelof Hut; [www.eurolock.org](http://www.eurolock.org)) eine harmonische Regression durchgeführt, um eine Cosinor-Funktion zu erhalten. Hierbei wurde eine Periodenlänge von 24 Stunden angenommen, und ein Fehlerbereich von  $\alpha = 0,05$  definiert. Mit der Regression ermittelt das Programm dabei

auch die Schwerpunkte der Kurvenverläufe für jeden Probanden und jedes Gen, welche einen Indikator für die Phase des Rhythmus darstellen und damit auch Auskunft über die Akrophase geben. Da hieraus Vektoren errechnet wurden, ist eine herkömmliche Berechnung von Durchschnitt und Standardabweichung nicht anwendbar. Anstelle dessen ist die Anwendung einer zirkulären Statistik nötig, weshalb die weitere Berechnung der phasenabhängigen Daten mit dem Programm Oriana (Kovach Computing Services, Großbritanien) erfolgte. Es wurden die Schwerpunktswerte nach Genen und Gruppe sortiert, in Rayleight-Plots aufgetragen und die Unterschiede zwischen den Gruppen mittels Watson-Williams F-Test auf Signifikanz untersucht. Für weitere Parameter wie Periodenlänge und Amplitude wurden das LumiCycle Analyse Programm (Actimetrics) und GraphPad (GraphPad Software Inc.) benutzt. Zunächst wurden die Rohdaten gegenüber den Werten der Leermessung korrigiert und im Anschluss aus den erhaltenen Daten ein Kurvenverlauf errechnet, aus dem entsprechende Parameter abgeleitet werden konnten. Die statistische Auswertung der Daten der Real-Time PCR wurde mithilfe der Programme SPSS (IBM Corporation) und JASPStats (<http://jasp-stats.org>) durchgeführt. Bei den Genanalysen handelt es sich um zeitliche Verläufe, die in Abhängigkeit von der jeweiligen Gruppe untersucht wurden. Der Zusammenhang von Zeit und Gruppe wurde daher mittels mixed ANOVA als Zeit x Gruppe-Interaktion analysiert. Der Mauchly-Test ergab eine Verletzung der Sphärizität, weshalb eine Korrektur der Freiheitsgrade nach Greenhouse-Geisser vorgenommen werden musste. Bei der Interpretation aller statistischen Ergebnisse wurde  $p < 0,05$  als Grenzwert für Signifikanz bei Vergleichen zwischen den Gruppen festgelegt.

Tabelle 2: Kenngrößen der aktigraphischen Auswertung.

Kenngröße	Erklärung
<b>Relative Amplitude (RA)</b>	Differenz M10 und L5, Variabilität der motorischen Aktivität
<b>Interdaily Stability (IS)</b>	Stabilität der Rhythmik als Ausdruck für Synchronisation an Zeitgeber
<b>Intradaily Variability (IV)</b>	Fragmentierung des Rhythmus
<b>Motorische Aktivität während der Periode der zehn aktivsten Stunden (M10)</b>	Repräsentiert die motorische Aktivität am Tag
<b>Motorische Aktivität während der Periode der fünf inaktivsten Stunden (L5)</b>	Repräsentiert die motorische Aktivität während der Hauptschlafzeit
<b>Schlafeffizienz</b>	Anteil der tatsächlich schlafend verbrachten Zeit an gesamter Zeit im Bett
<b>Wakening after Sleep Onset (WASO)</b>	Gesamtzeit der nächtlichen Wachphasen nach initialem Einsetzen des Schlafs
<b>Anzahl nächtlicher Wachphasen</b>	Dient Charakterisierung von Durchschlafstörungen
<b>Dauer nächtlicher Wachphasen</b>	Dient Charakterisierung von Durchschlafstörungen

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Soziodemografie**

Insgesamt gelang es, für die Patientengruppen je 17 Probanden und für die Kontrollgruppe 25 Probanden zu rekrutieren. Wie im Abschnitt 2.1.4 ausführlich dargestellt, erfolgten zunächst die Aufklärung und Einwilligung, anschließend die Bearbeitung von Fragebögen und Interview, das Tragen der Actiwatch und die Entnahme der Hautproben der Probanden. Hinsichtlich der Fragebögen konnten alle Daten wie geplant erhoben werden. Die dabei gewonnenen Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt. In Bezug auf die in der Tabelle dargestellten Variablen ergeben sich für Alter, Größe, Gewicht, BMI und IQ keine signifikanten Unterschiede im Varianzvergleich mittels ANOVA und Post-hoc-Test. Auch für das Geschlecht konnten mittels Chi-Quadrat-Test keine signifikanten Unterschiede in der Gruppenverteilung festgestellt werden. Eine Vergleichbarkeit der Gruppe aus soziodemografischer Sicht kann daher angenommen werden.

Betrachtet man die durchschnittlich erreichten Scores im WURS-k, zeigten sich, wie erwartet, signifikante Unterschiede jeweils zwischen den Patientengruppen und der Kontrollgruppe ( $p < 0,001$ ), wobei die Kontrollen einen Wert deutlich unterhalb des Cut-Offs erzielten. Interessanterweise erzielten auch beide Patientengruppen Mittelwerte, die sich signifikant voneinander unterscheiden ( $p = 0,013$ ). Dabei wurde die Symptomausprägung im Kindesalter in der Gruppe der medikamentös behandelten Patienten als ausgeprägter eingeschätzt als in der Gruppe ohne Medikamente.

Es konnte festgestellt werden, dass sich die Gruppen hinsichtlich der Schwere der ADHS-Symptomatik voneinander unterschieden ( $F_{2,56} = 96,188, p < 0,001$ ). Mittels Post-hoc-Test wurde dabei ein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und beiden ADHS-Gruppen gefunden ( $p < 0,001$ ), die beiden Patientengruppen unterschieden sich allerdings nicht voneinander hinsichtlich der Ausprägung der ADHS-Symptomatik ( $p = 0,998$ ).

Die Häufigkeit des Auftretens der Subtypen der ADHS zeigte eine Ungleichverteilung in beiden Patientengruppen ( $\chi^2(2) = 9,238; p = 0,009$ ). Der kombinierte Typ war in der Gruppe der Patienten mit Medikation überrepräsentiert, wohingegen der vorwiegend hyperaktive und der unaufmerksame Subtyp unterrepräsentiert waren.

Tabelle 3: Soziodemografische Kenngrößen nach Gruppen.

Kriterium	ADHS mit Medikation	ADHS ohne Medikation	Kontrollgruppe
<b>Probandenanzahl</b>	<i>n</i> = 17	<i>n</i> = 17	<i>n</i> = 25
<b>Alter [Jahre]</b>	29,3 ± 10,9	37,1 ± 9,97	38,8 ± 12,2
<b>Männlich</b>	8 (47,1 %)	10 (58,8 %)	12 (48 %)
<b>Weiblich</b>	9 (52,9 %)	7 (41,2 %)	13 (52 %)
<b>Größe [cm]</b>	172,5 ± 7,1	172,6 ± 10,3	174,8 ± 8,7
<b>Gewicht [kg]</b>	73,9 ± 13,4	74,8 ± 11,91	77,48 ± 17,60
<b>BMI</b>	24,95 ± 4,83	25,06 ± 3,07	25,13 ± 4,41
<b>IQ</b>	109,1 ± 13,0	107,8 ± 10,9	117,3 ± 13,6
<b>WURS-k Score</b>	46,4 ± 11,2 ***	35,8 ± 10,6 ***	11,8 ± 9,4
<b>ADHS-Score</b>	26,12 ± 7,48 ***	25,2 ± 4,8 ***	5,8 ± 4,1
<b>D-MEQ-Score</b>	49,3 ± 13,0	43,3 ± 11,1 **	55,7 ± 11,4
<b>ADHS Subtyp</b>			
<b>Hyperaktiv</b>	0	3	0
<b>Unaufmerksam</b>	1	6	0
<b>Kombiniert</b>	16	8	0

BMI = Body-Mass-Index, IQ = Intelligenzquotient, WURS-k = Kurzversion der Wender Utah Rating Scale, D-MEQ = deutsche Version des Morningness-eveningness questionnaire, ADHS = Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung, \*\* = Signifikanzniveau (*p*) < 0,01, \*\*\* = *p* < 0,001.

Unterschieden wurden die Patientengruppen hinsichtlich der Einnahme von ADHS-spezifischer Medikation, wie in Abschnitt 2.1.3 erläutert. Eine Auflistung der eingenommenen Medikamente je Gruppe ist in Tabelle 4 ersichtlich. Zum Zeitpunkt der Studienteilnahme wurde Methylphenidat von insgesamt 14 Probanden eingenommen, neun davon nahmen ausschließlich Methylphenidat ein. Vier Patienten wurden mit Atomoxetin therapiert. Ein Proband erhielt hierbei sowohl Methylphenidat als auch Atomoxetin. Internistische Medikation wurde von einzelnen Probanden eingenommen. Da diese Teilnehmer in allen Gruppen vertreten waren und es sich um weit verbreitete Substanzen handelt, erfolgte kein Studienausschluss.

*Tabelle 4:* Während der Studienteilnahme eingenommene Medikation je Gruppe.

Gruppe	Medikament	Anzahl
<b>ADHS mit Med.</b>	Methylphenidat	9
	Methylphenidat + Atomoxetin	1
	Methylphenidat + Nebivolol	1
	Methylphenidat + Citalopram	1
	Methylphenidat + Venlafaxin	2
	Atomoxetin + Pregabalin	1
	Atomoxetin + Sertraline	1
	Atomoxetin + Bisoprolol	1
<b>ADHS ohne Med.</b>	Amitriptylin	1
	Venlafaxin	1
	L-Thyroxin	1
	Keine	14
<b>Kontrollgruppe</b>	L-Thyroxin	2
	Lorsartan	1
	Metoprolol	1
	Ramipril	1
	Keine	20

ADHS = Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung, Med. = ADHS-spezifische Medikation.

In beiden Patientengruppen zeigten sich psychiatrische Komorbiditäten, welche, übereinstimmend mit den festgelegten Ausschlusskriterien zum Zeitpunkt der Studienteilnahme, als nicht führend anzusehen waren. Die Verteilung der Komorbiditäten ist in Tabelle 5 aufgeführt. In der Kontrollgruppe lagen keine psychiatrischen Komorbiditäten vor.

*Tabelle 5:* Psychiatrische Komorbiditäten der Patientengruppen.

<b>Psychiatrische Komorbiditäten</b>	<b>ADHS mit Med.</b>	<b>ADHS ohne Med.</b>
Keine	9	8
Angststörung	1	0
Depression	4	3
PTBS	2	0
Borderline-PS	3	4
Zwanghafte PS	2	0
Dissoziale PS	0	1
Histrionische PS	0	1
Vermeidende PS	0	1

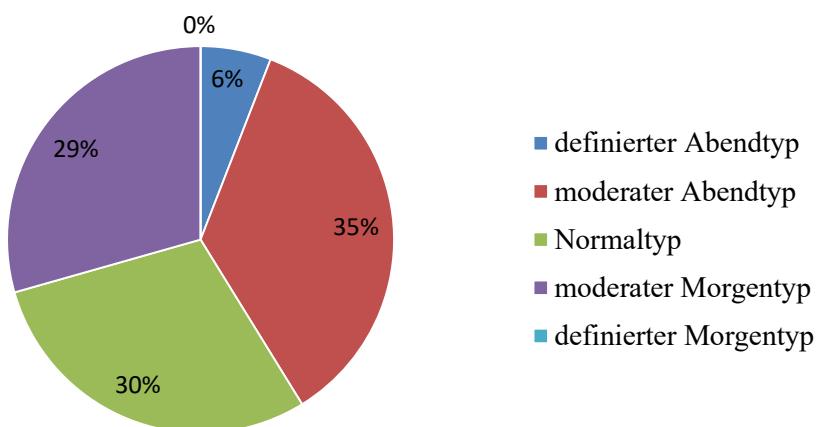
ADHS = Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung, Med. = ADHS-spezifische Medikation,

PTBS = Posttraumatische Belastungsstörung, PS = Persönlichkeitsstörung.

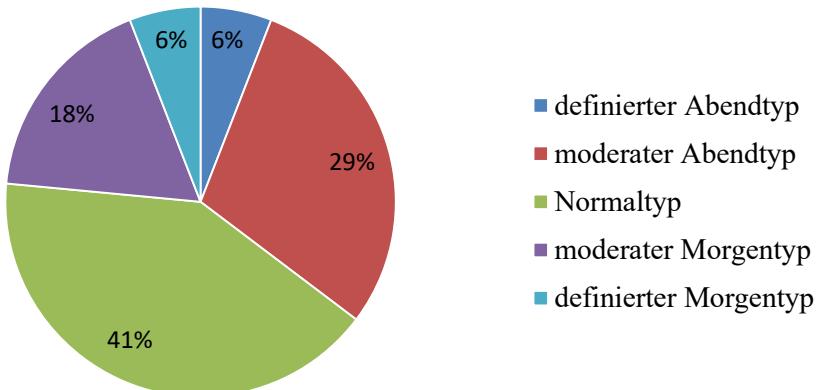
### **3.2 Chronotypisierung nach D-MEQ**

Bei den tageszeitlichen Präferenzen, erfasst durch den D-MEQ, traten in der Kontrollgruppe vornehmlich der Normaltyp und der Morgentyp auf. Im Vergleich dazu zeigten die ADHS-Gruppen eine Tendenz hin zum Abendtyp. Mit Blick auf den durchschnittlich erreichten Score in den Gruppen der nicht-medizierten Patienten und der Kontrollen zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,031$  nach ANOVA). Dagegen gab es zwischen beiden Patientengruppen und auch zwischen der ADHS-Gruppe mit Medikation und der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 5).

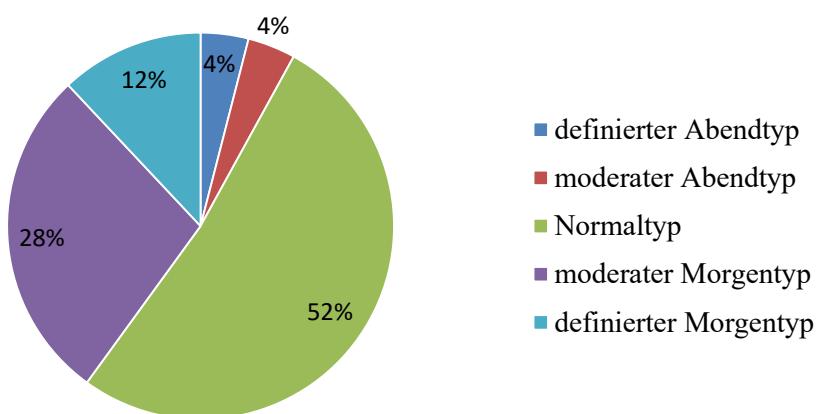
### **ADHS ohne Medikation**



### **ADHS mit Medikation**



### **Kontrollgruppe**

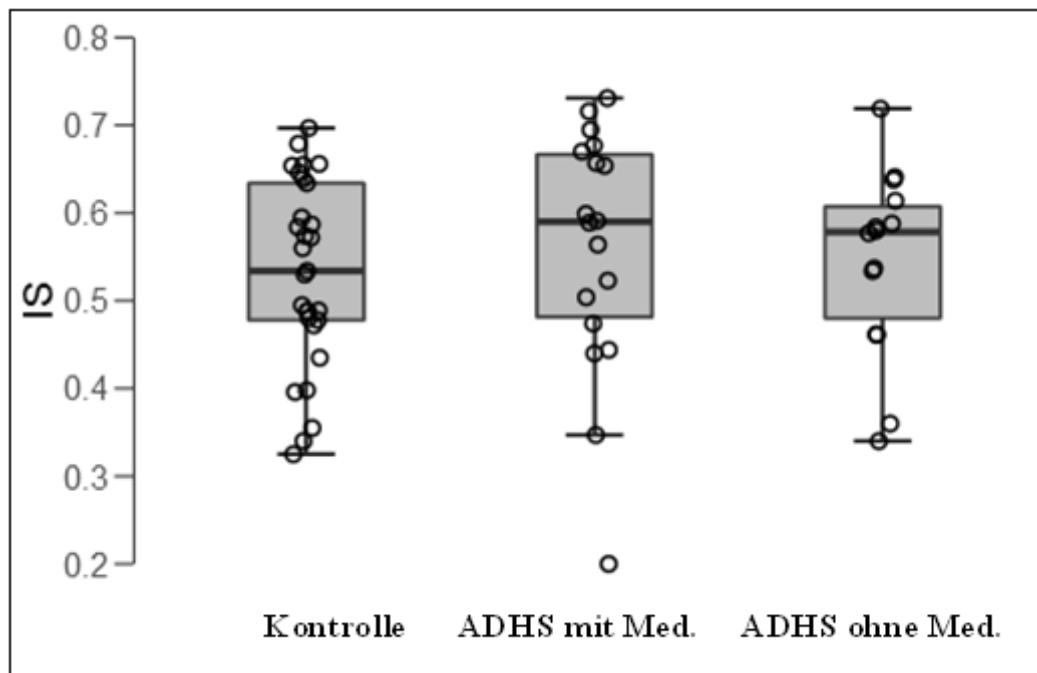


*Abbildung 5:* Prozentuale Verteilung der Chronotypen nach D-MEQ, dargestellt für die einzelnen Versuchsgruppen.

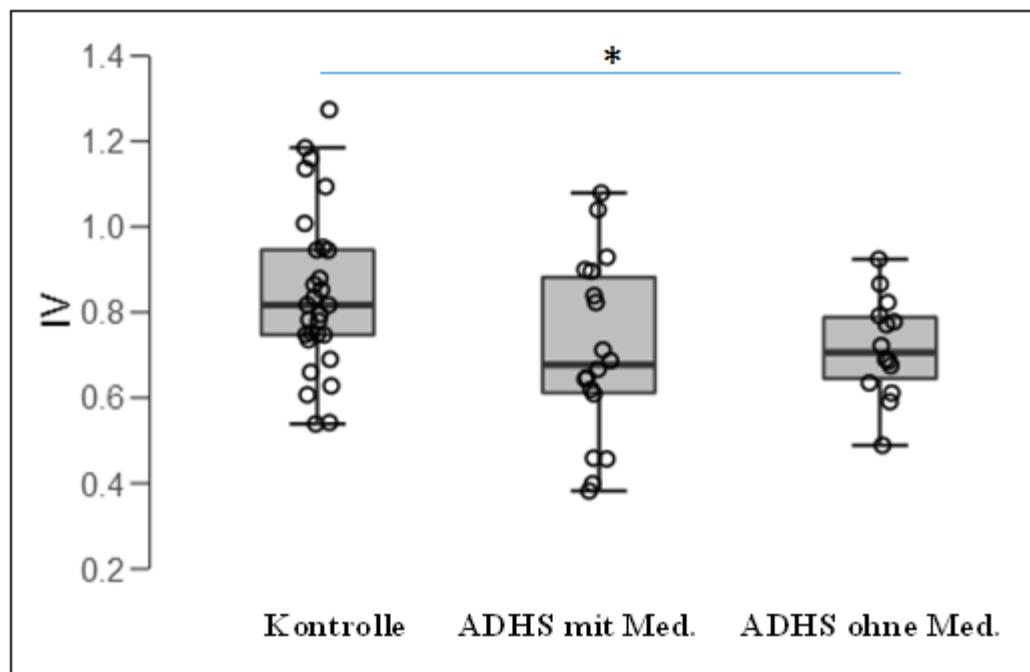
### **3.3 Analyse aktigraphischer Parameter**

Um in vivo Daten zur circadianen Rhythmik der Probanden zu erhalten, erfolgte die Aufzeichnung der Aktivität mittels Actiwatch. Einbezogen in die Analysen wurden alle Probanden, die das Gerät für sieben Tage getragen haben. Insgesamt konnten in der Kontrollgruppe und in der ADHS-Gruppe ohne Medikation von allen Teilnehmern die Daten gewonnen werden. In der ADHS-Gruppe mit Medikation sind von einem Teilnehmer keine ausreichenden Daten vorhanden und ein Wiederholen des Tragens wurde von Seiten des Probanden abgelehnt. Somit konnten in dieser Gruppe nur 16 Messungen in die Berechnung einfließen.

Um das Timing und die Stabilität des circadianen Rhythmus beurteilen zu können, erfolgte die Analyse von IS, IV und RA. Es ließen sich zwischen den drei Versuchsgruppen relevante Effekte nachweisen (Wilks Lambda = 0,721,  $F_{6, 108} = 3,2$ ,  $p = 0,006$ ,  $\eta^2 = 0,15$ ). Hinsichtlich der IS konnte dabei zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p = 0,77$ ). Die Synchronisation an äußere Zeitgeber scheint damit in den Gruppen ähnlich stabil zu sein (Abbildung 6). Die Analyse der IV jedoch zeigte Gruppenunterschiede ( $p = 0,026$ ,  $\eta^2 = 0,1222$ ). Mittels Post-hoc-Test und Bonferroni-Korrektur konnte eine kleinere IV in der Patientengruppe ohne ADHS-Medikation im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden ( $p = 0,046$ ), was für länger andauernde, zusammenhängende Schlaf- und Wachzeiten in der nicht-medizierten Patientengruppe spricht. In der Patientengruppe mit ADHS-spezifischer Medikation gab es keine signifikanten Unterschiede zu den anderen Gruppen hinsichtlich der IV (Abbildung 7). Im Hinblick auf die RA der Aktivität konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden ( $p = 0,006$ ,  $\eta^2 = 0,166$ ). Zwar ergaben gruppenweise Vergleiche mittels Bonferroni-Korrektur zwischen der Kontrollgruppe und den nicht-medizierten ADHS-Patienten keine signifikant veränderte RA, wohl aber zwischen den Kontrollprobanden und den ADHS-Patienten, die Medikamente einnahmen ( $p < 0,001$ ). Unter Berücksichtigung des Stärke der ADHS-Symptomatik wurde auch eine Abnahme der RA in der medizierten Gruppe im Vergleich zur nicht medizierten Patientengruppen deutlich ( $p = 0,005$ ; Abbildung 8). In der Medikamentengruppe wurde damit die kleinste RA der Vergleichsgruppen gemessen.



*Abbildung 6:* Stabilität der Rhythmik über mehrere Tage (Interdaily Stability [IS]) im Gruppenvergleich. Hierbei sind für die IS Werte zwischen 0 und 1 möglich. Je höher die IS, desto stabiler ist die Rhythmik hinsichtlich der Verteilung von Schlaf- und Wachphasen, was für eine gute Synchronisation an äußere Zeitgeber spricht (Med. = ADHS-spezifische Medikation).



*Abbildung 7:* Variabilität der Rhythmik innerhalb eines Tages (intradaily variability [IV]) im Gruppenvergleich. Hohe Werte der IV sprechen für eine starke Fragmentierung der Rhythmik, welche durch häufigen Wechsel von Schlaf- und Wachphasen entsteht (Med. = ADHS-spezifische Medikation; \* =  $p < 0,05$ ).

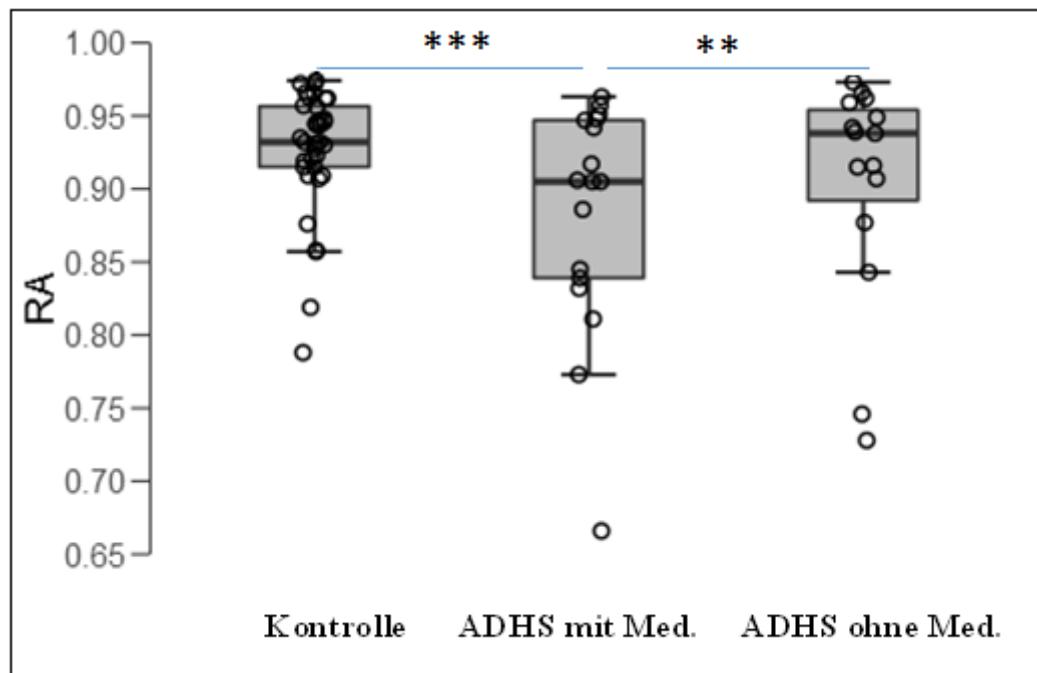


Abbildung 8: Relative Amplitude (RA) der Aktivität im Tagesverlauf. Hohe RA-Werte sprechen dabei für große Unterschiede der Aktivität im Verlauf eines Tages, insbesondere zwischen Schlaf- und Wachphasen (Med. = ADHS-spezifische Medikation; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

Für die Untersuchung der Schlafperiode wurden die L5, Schlafeffizienz und die Aktivitätszählungen während des Schlafs analysiert. Auch hier konnten mittels MANCOVA Gruppeneffekte nachgewiesen werden (Wilks Lambda = 0,68,  $F_{6, 122} = 0,001$ ,  $\eta^2 = 0,176$ ). Anhand der L5 ist zu erkennen, dass die nächtliche Aktivität in der Patientengruppe mit ADHS-Medikation signifikant höher war als in der Kontrollgruppe ( $p = 0,006$ ) und in der Patientengruppe ohne ADHS-Medikation ( $p = 0,029$ ; Abbildung 9). Die Schlafeffizienz stellte sich in der Patientengruppe mit ADHS-Medikation im Vergleich zur Patientengruppe ohne Medikation ( $p = 0,002$ ) und auch im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < 0,001$ ) deutlich reduziert dar (Abbildung 10). Im Gegensatz zur Schlafeffizienz ( $p = 0,001$ ,  $\eta^2 = 0,2$ ) und L5 ( $p = 0,008$ ,  $\eta^2 = 0,14$ ) war in der Gesamtaktivitätszählung während des tatsächlichen Schlafs kein signifikanter Effekt ( $p = 0,06$ ) nachweisbar (Abbildung 11). Die medikamentös behandelten ADHS-Patienten zeigten somit während der fünf am wenigsten aktiven Stunden in der Nacht die vergleichsweise höchsten Aktivitätswerte und schließen relativ betrachtet weniger als die Probanden der anderen Gruppen bei gleicher im Bett verbrachter Zeit. Die Anzahl der Aktivitätsaufzeichnungen im Schlaf selbst unterschieden sich allerdings zwischen den Gruppen nicht.

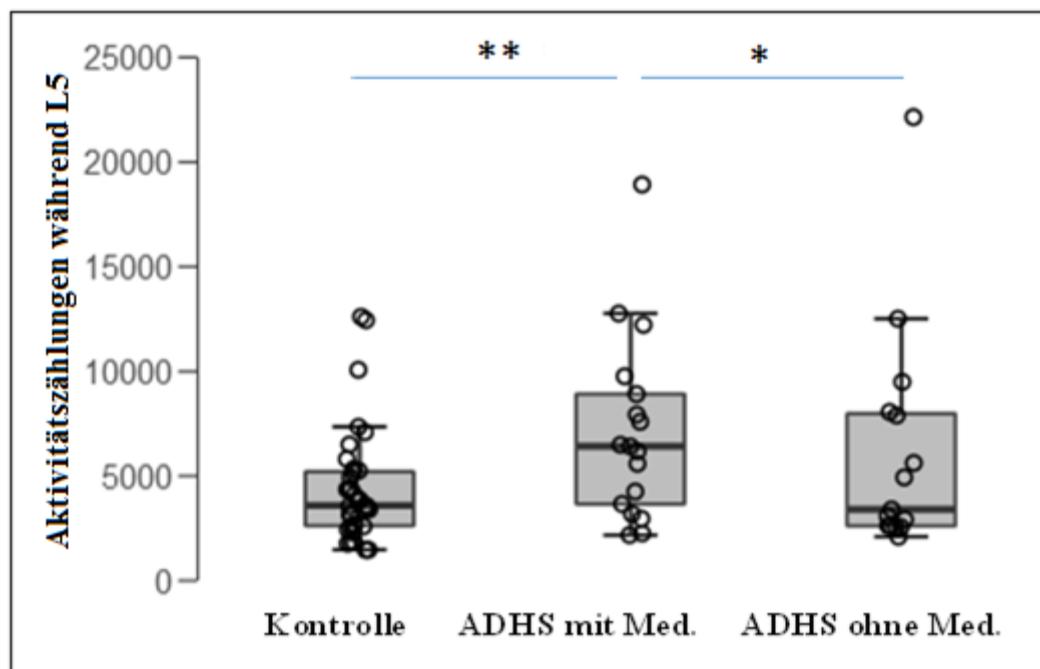


Abbildung 9: Anzahl an Aktivitätszählungen während der fünf inaktivsten Stunden (L5) eines Tages im Gruppenvergleich (Med. = ADHS-spezifische Medikation; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ).

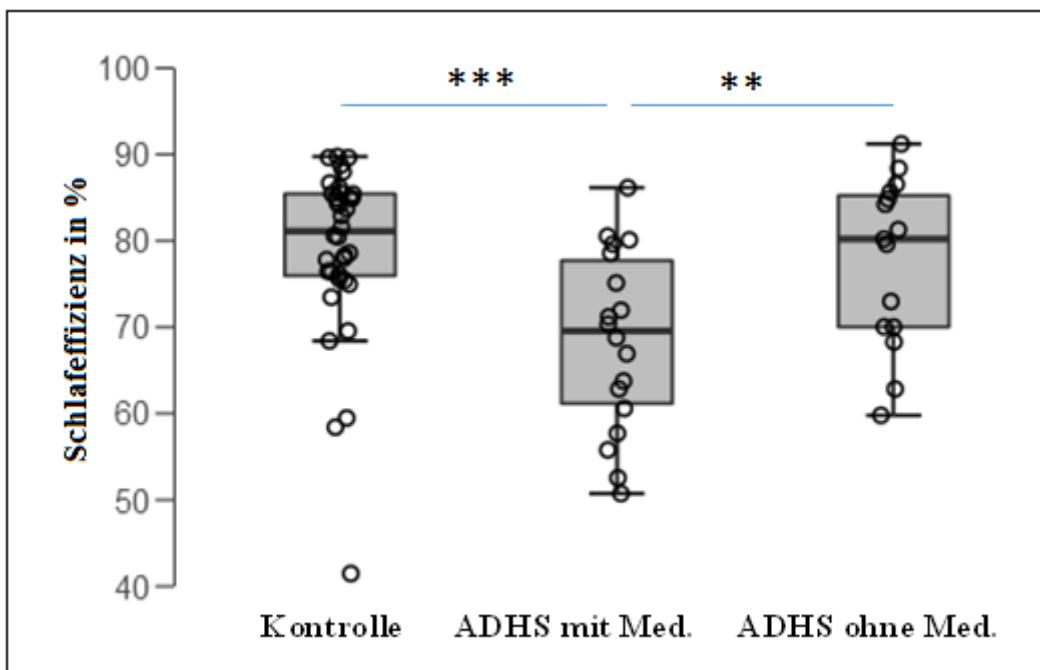


Abbildung 10: Schlafeffizienz in Prozent im Gruppenvergleich. Die Schlafeffizienz bildet dabei den Anteil der im Bett verbrachten Zeit ab, die tatsächlich schlafend verbracht wurde (Med. = ADHS-spezifische Medikation; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

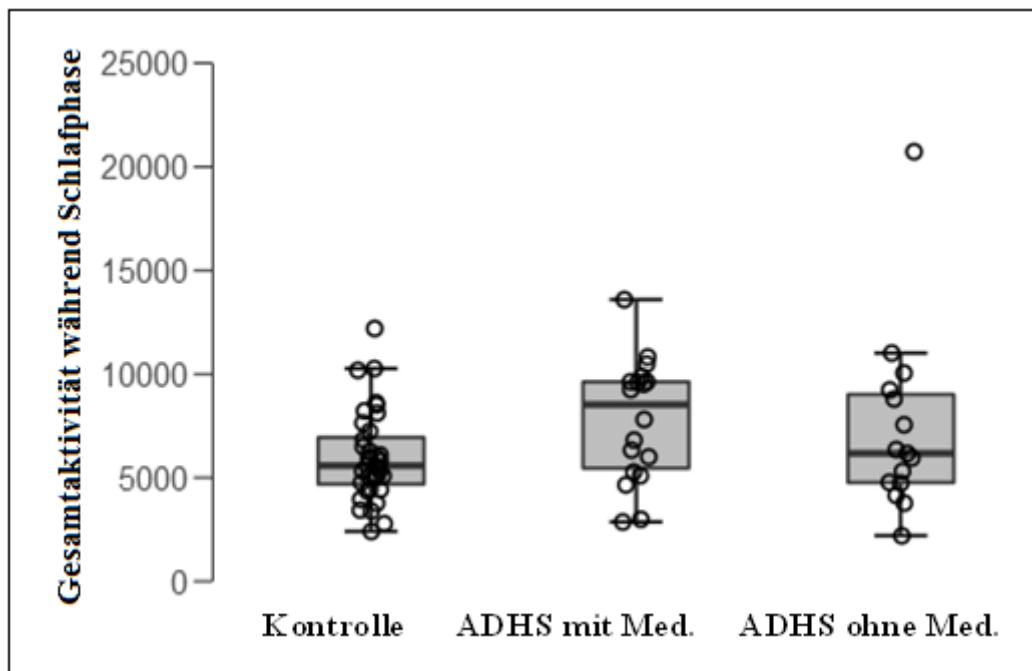


Abbildung 11: Anzahl der Aktivitätszählungen während der tatsächlich schlafend verbrachten Zeit im Gruppenvergleich (Med. = ADHS-spezifische Medikation).

Die oben beschriebenen Unterschiede in der nächtlichen Aktivität legen eine weiterführende Analyse der Wachphasen während der Nacht nahe. Hierzu wurden die Gruppen hinsichtlich der Parameter WASO, Häufigkeit des Erwachens, und durchschnittlicher Dauer der Wachphasen miteinander verglichen. Mittels MANCOVA konnten hierbei signifikante Gruppenunterschiede festgestellt werden (Wilk's Lamda = 0,77;  $F_{6, 122}=2,9$ ;  $p = 0,011$ ;  $\eta^2 = 0,125$ ). Bei der Analyse der WASO wurden Gruppeneffekte deutlich ( $p = 0,001$ ,  $\eta^2 = 0,21$ ). Die Gesamtzeit, die nach dem initialen Einsetzen des Nachschlafs wach verbracht wurde, war in der ADHS-Patientengruppe mit Medikation gegenüber der Patientengruppe ohne Medikation ( $p = 0,003$ ) und gegenüber der Kontrollgruppe ( $p < 0,001$ ) signifikant länger (Abbildung 12). Die Anzahl der Wachphasen in der Gruppe der ADHS-Patienten ohne Medikation war am geringsten, am höchsten war sie in der Patientengruppe mit Medikation. Insgesamt konnte hinsichtlich der Anzahl der nächtlichen Wachphasen zwischen den Versuchsgruppen jedoch kein signifikanter Unterschied ermittelt werden (Abbildung 13). Auch die durchschnittliche Dauer der einzelnen nächtlichen Wachphasen zeigte Gruppeneffekte ( $p = 0,001$ ,  $\eta^2 = 0,21$ ). Post-Hoc-Tests ergaben eine signifikante Verlängerung der nächtlichen Wachphasen in der ADHS-Gruppe mit Medikation im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < 0,001$ ) und der ADHS-Gruppe ohne Medikation ( $p = 0,005$ ). Im Gegensatz zu den anderen Gruppen brauchten die Probanden der ADHS-Gruppe mit Medikation deutlich länger, um wieder in den Schlaf zu finden (Abbildung 14).

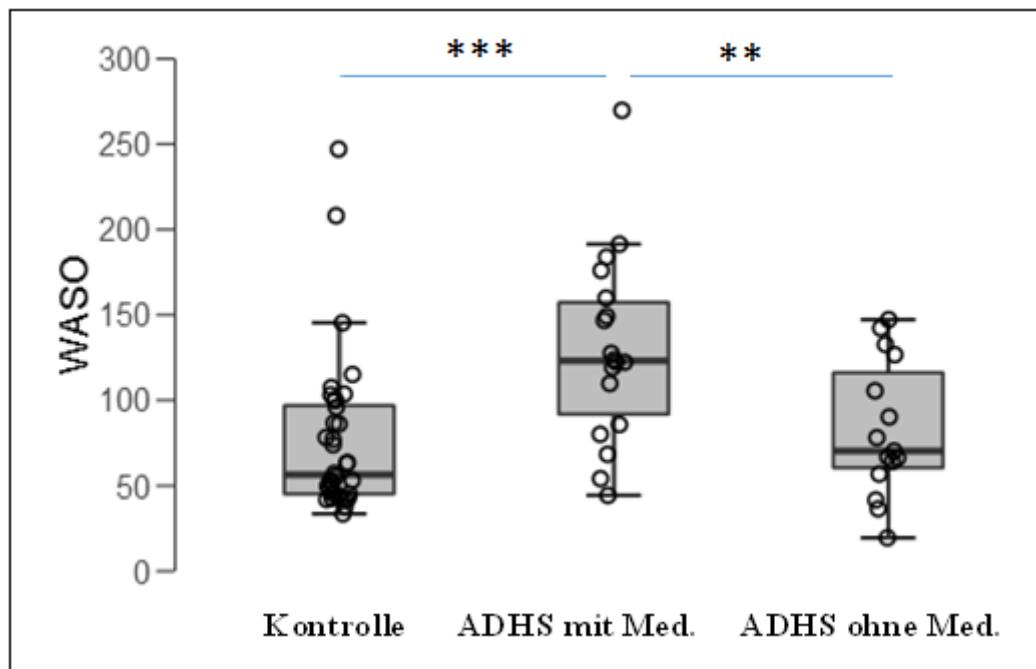


Abbildung 12: Zeit, die wach verbracht wurde, nach initialem Einsetzen des Nachschlafs in Minuten (Wakening after Sleep Onset [WASO]) im Gruppenvergleich (Med. = ADHS-spezifische Medikation; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

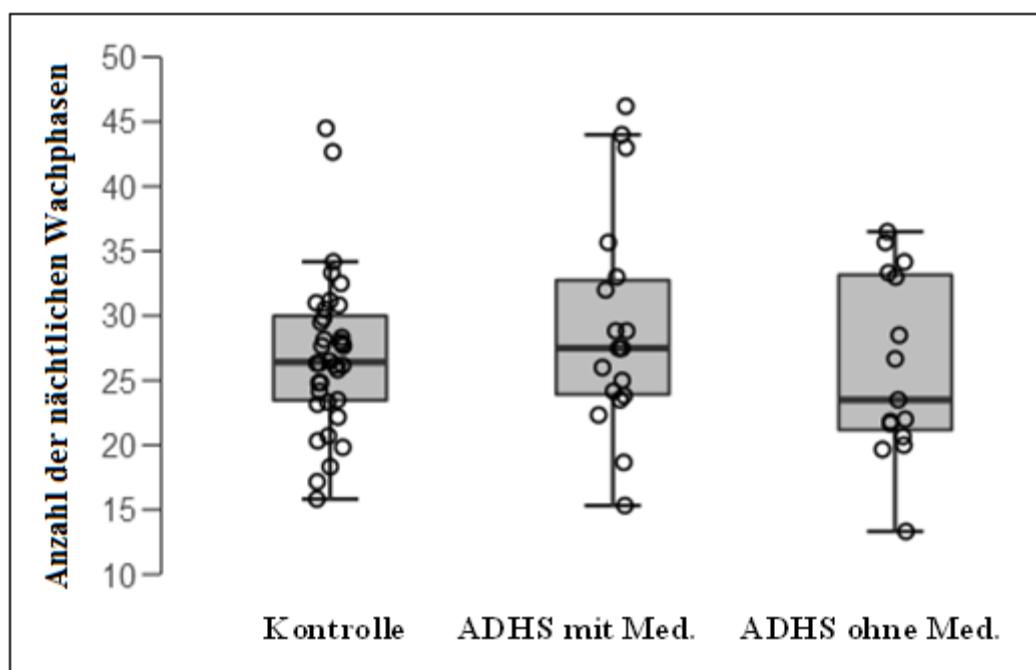


Abbildung 13: Anzahl der nächtlichen Wachphasen im Gruppenvergleich (Med. = ADHS-spezifische Medikation).

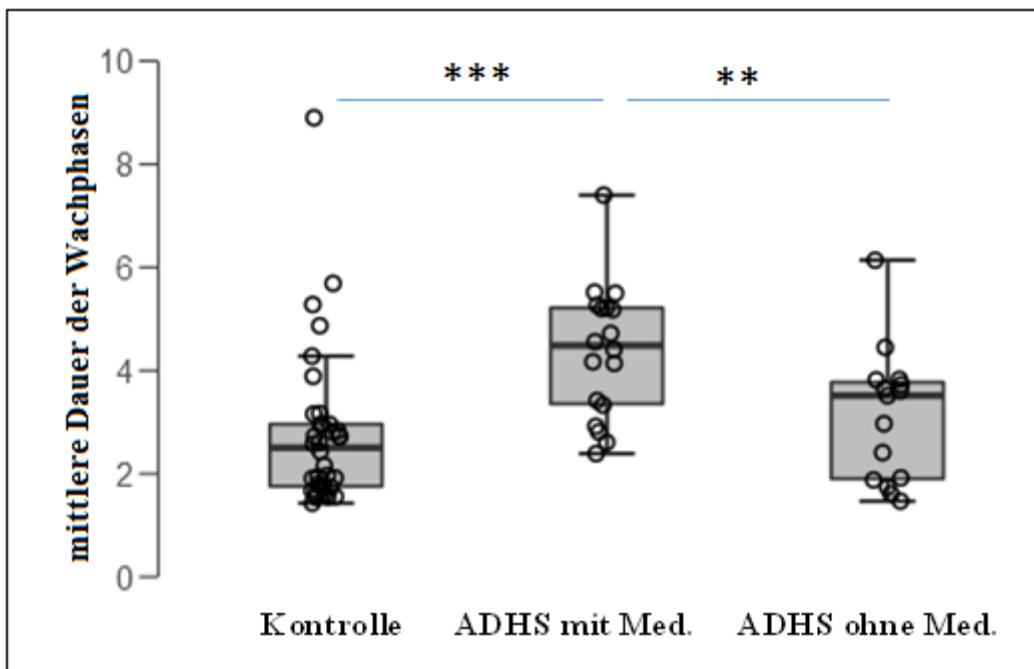


Abbildung 14: Durchschnittliche Dauer der einzelnen Wachphasen in der Nacht in Minuten im Gruppenvergleich (Med. = ADHS-spezifische Medikation; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

## **3.4 In vitro gemessene Expressionsverläufe der Clock-Gene**

### **3.4.1 Real-Time PCR**

Um den endogenen Rhythmus der Probanden abschätzen zu können, erfolgte die Analyse der Clock-Gene anhand eines Fibroblastenmodells. Die Entnahme von Fibroblasten durch Hautstanze erfolgte bei allen Studienteilnehmern, jedoch gelang es nicht bei allen Biopsien die Zellen erfolgreich zu kultivieren. Teilweise erfolgte deshalb bei Zustimmung des Probanden eine erneute Hautprobenentnahme, welche jedoch trotzdem nicht immer dazu führte, dass eine verwendbare Zellkultur gewonnen werden konnte. Lehnten die Teilnehmer eine erneute Hautbiopsie ab, konnte ebenfalls keine Kultur erfolgen. Insgesamt konnten in der Kontrollgruppe von allen Probanden Zellkulturen gewonnen werden. In den Patientengruppen gelang dies bei jeweils 15 Patienten.

Bei der Analyse der einzelnen Clock-Gene zeigte sich für *CRY1*, dass die Akrophase des Expressionsmusters in der Kontrollgruppe und in der Gruppe der medizierten Patienten vier Stunden betrug. Auch in der nicht-medizierten ADHS-Gruppe kam es nach dieser Zeit zu einem Peak. Danach sanken die Expressionswerte in allen Gruppen wieder ab. Acht Stunden nach Synchronisation war in der Patientengruppe ohne Medikation ein deutlich niedrigerer Wert messbar als in den beiden Vergleichsgruppen, wobei die Unterschiede sowohl gegenüber der Kontrollgruppe ( $p = 0,005$ ), als auch gegenüber der medizierten ADHS-Gruppe ( $p = 0,021$ ) als signifikant anzusehen sind. In der Gruppe der nicht-medizierten Patienten kam es 12 Stunden nach Synchronisation zu einem zweiten Peak, bei welchem deutlich höhere relative Expressionswerte gemessen werden konnten als beim ersten Peak. In den anderen Gruppen trat kein zweiter Peak auf. 12 Stunden nach Synchronisation war somit ein signifikanter Unterschied der Expression von *CRY1* in der ADHS-Patientengruppe ohne Medikation gegenüber der Kontrollgruppe ( $p = 0,014$ ) und auch gegenüber der Patientengruppe mit Medikation ( $p = 0,009$ ) feststellbar (Abbildung 15). Die Interaktion von Zeit x Gruppe war für *CRY1* als signifikant anzusehen ( $F_{44,9,122} = 0,64$ , Greenhouse-Geisser korrigiert  $p < 0,001$ ).

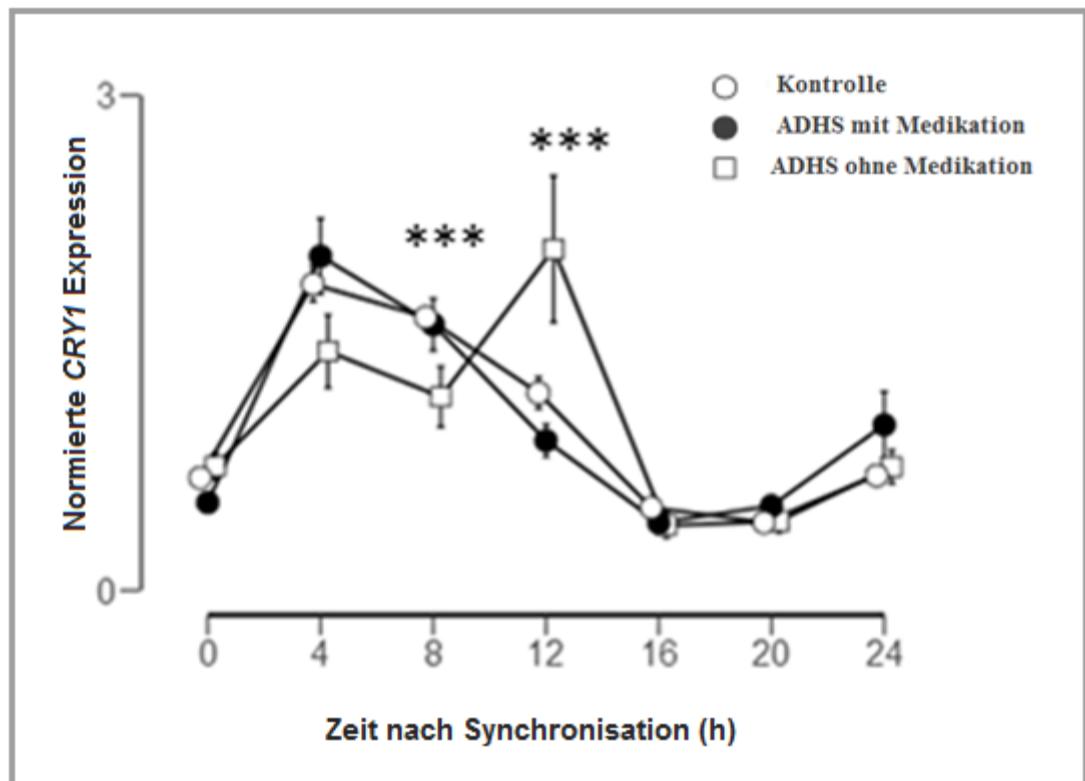


Abbildung 15: Expressionswerte von *CRY1* im zeitlichen Verlauf nach Synchronisation, welche zum Zeitpunkt ZT0 erfolgte (\*\* =  $p < 0,001$ , h = Stunden).

Nach entsprechender Analyse zeigte sich für *PER2*, dass in allen drei Versuchsgruppen der maximale relative Expressionswert vier Stunden nach Synchronisation messbar war. Die geringste relative Expression war ebenfalls zeitlich ähnlich verteilt: zwischen 12 und 16 Stunden nach Synchronisation. Eine ausgeprägte Phasenverschiebung konnte bei *PER2* damit nicht festgestellt werden. Allerdings war die Expression zum Zeitpunkt null (ZT0) nach Synchronisation in der Patientengruppe ohne Medikation deutlich höher als in den anderen Versuchsgruppen. Im Post-hoc-Test bestätigte sich dieser Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe ( $p = 0,016$ ) und auch gegenüber der ADHS-Patientengruppe mit entsprechender Medikation ( $p = 0,037$ ) als signifikant erhöht (Abbildung 16). Auch die Zeit x Gruppe-Interaktion war als signifikant zu werten ( $F_{4,6,115} = 3,0$ ; Greenhouse-Geisser korrigiert  $p = 0,017$ ).

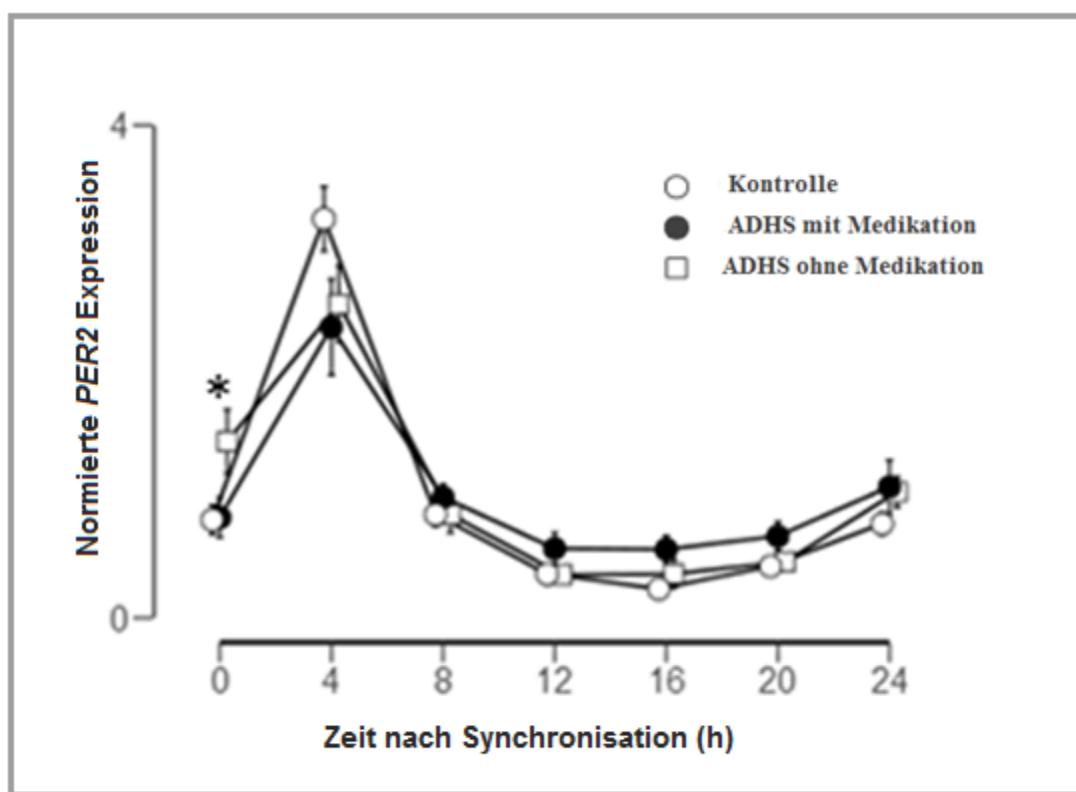


Abbildung 16: Expressionswerte von *PER2* im zeitlichen Verlauf nach Synchronisation, welche zum Zeitpunkt ZT0 erfolgte (\* =  $p < 0,05$ , h = Stunden).

Die relative Expression von *BMAL1* stellte sich in den Gruppen hinsichtlich der zeitlichen Verläufe ähnlich dar. Auch die Amplitude der relativen Expression zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung 17). Eine eindeutige Zeit x Gruppe-Interaktion war für *BMAL1* nicht feststellbar (Greenhouse-Geisser-Korrektur  $F_{8,7,216} = 1,15$ ;  $p = 0,326$ ).

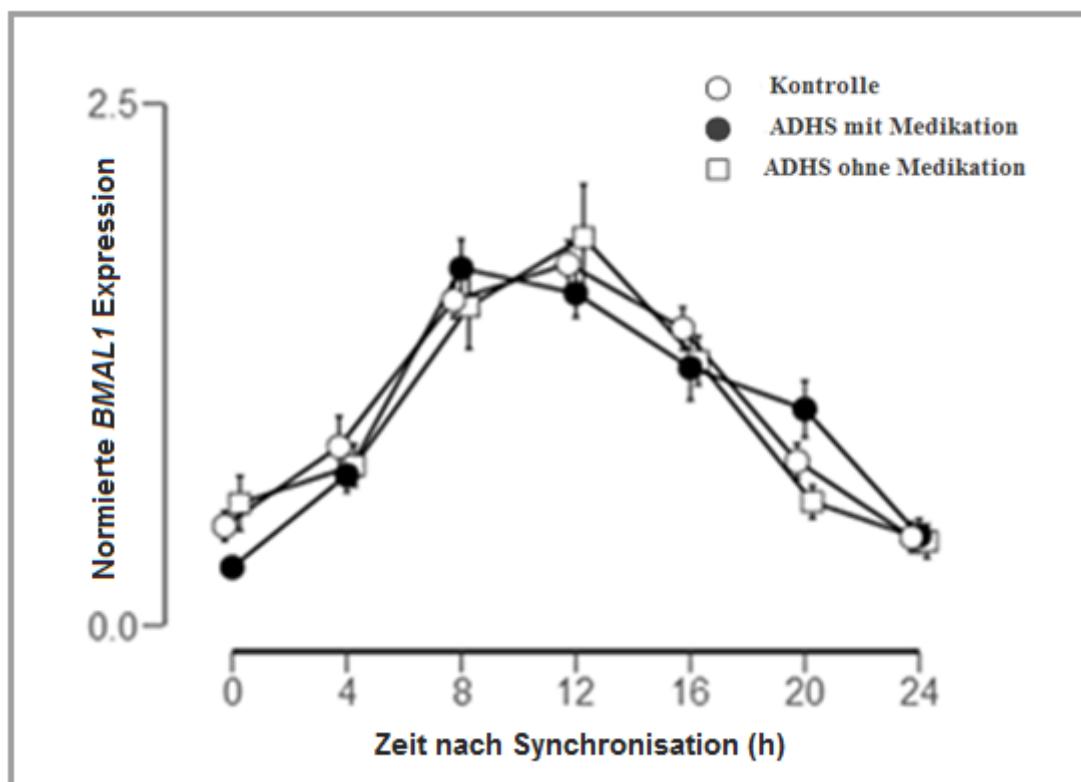


Abbildung 17: Expressionswerte von *BMAL1* im zeitlichen Verlauf nach Synchronisation, welche zum Zeitpunkt ZT0 erfolgte (h = Stunden).

Durch ANOVA konnte keine signifikante Zeit x Gruppe-Interaktion im Hinblick auf die Expressionswerte von *PER1* nachgewiesen werden (kontrolliert nach Geschlecht und Alter, Greenhouse-Geisser-Korrektur  $F_{4,6,115} = 3,0; p = 0,017$ ; Abbildung 18).

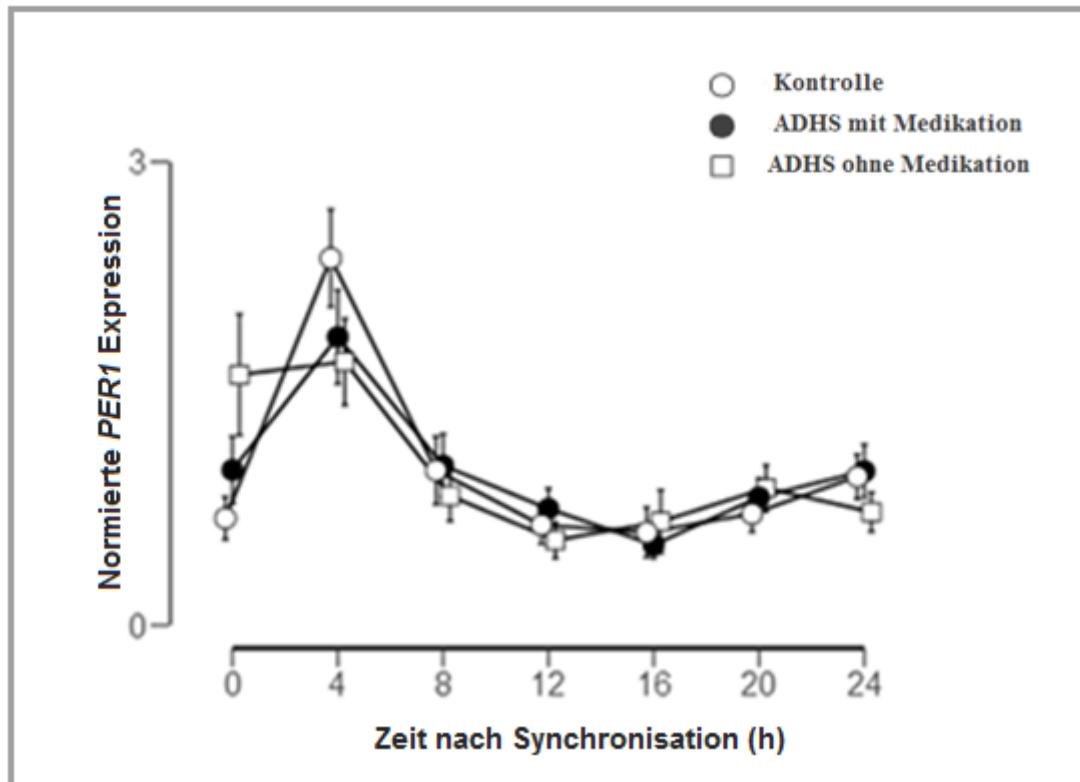


Abbildung 18: Expressionswerte von *PER1* im zeitlichen Verlauf nach Synchronisation, welche zum Zeitpunkt ZT0 erfolgte (h = Stunden).

Bei der Expression des Gens *PER3* konnte in allen drei Versuchsgruppen eine starke Rhythmisierung aufgezeichnet werden. Eine signifikante Zeit  $\times$  Gruppe-Interaktion zeigte sich jedoch nicht (Greenhouse-Geisser-Korrektur  $F_{3,4,85} = 0,64; p = 0,61$ ; Abbildung 19).

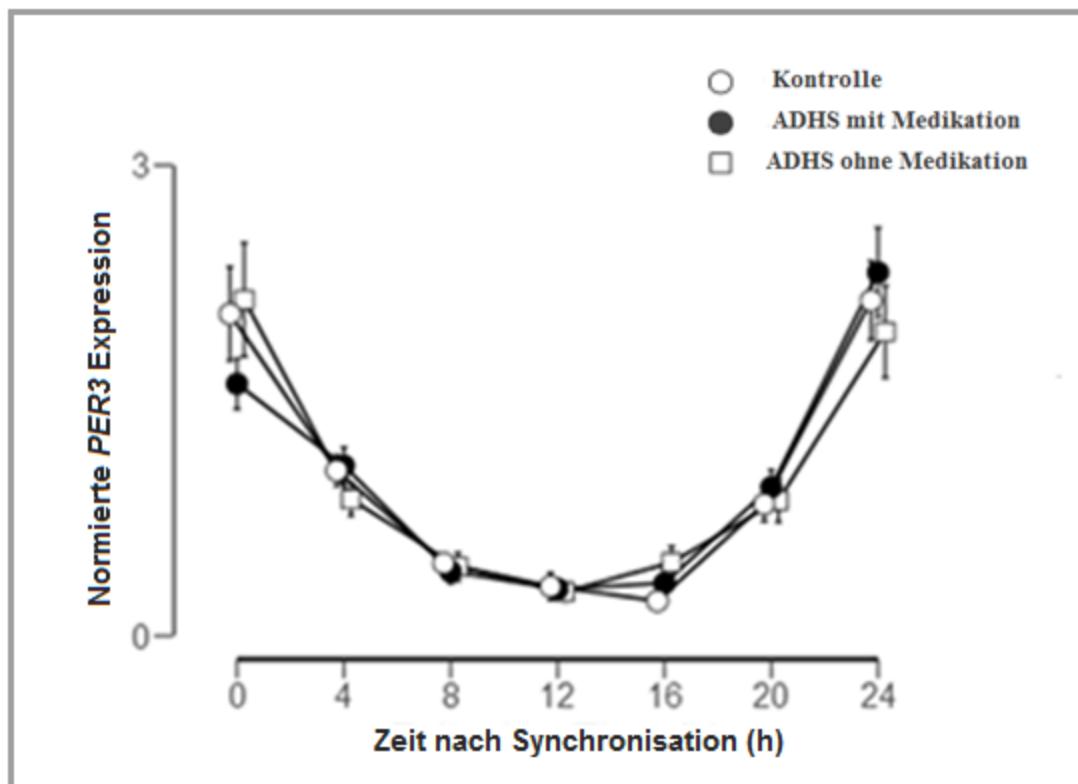


Abbildung 19: Expressionswerte von *PER3* im zeitlichen Verlauf nach Synchronisation, welche zum Zeitpunkt ZT0 erfolgte (h = Stunden).

Hinsichtlich der Expressionswerte für *CLOCK* war eine signifikante Zeit  $\times$  Gruppe-Interaktion nachweisbar (Greenhouse-Geisser-Korrektur  $F_{5,4,139} = 3,34; p = 0,005$ ). Direkt nach Synchronisation lag der Wert in der ADHS-Gruppe mit Medikation signifikant unterhalb der Werte der ADHS-Gruppe ohne Medikation ( $p = 0,03$ ) und der Kontrollgruppe ( $p = 0,021$ ). Im zeitlichen Verlauf glichen sich die Expressionswerte der Gruppen an. Nach 24 Stunden erreichte die Expression von *CLOCK* in der Patientengruppe mit Medikation allerdings einen signifikant höheren Wert als in der Kontrollgruppe ( $p = 0,015$ ). Insgesamt war die Amplitude der *CLOCK*-Expressionswerte deutlich größer in der ADHS-Gruppe mit Medikation als in der Kontrollgruppe und der Patientengruppe ohne Medikation (Abbildung 20).

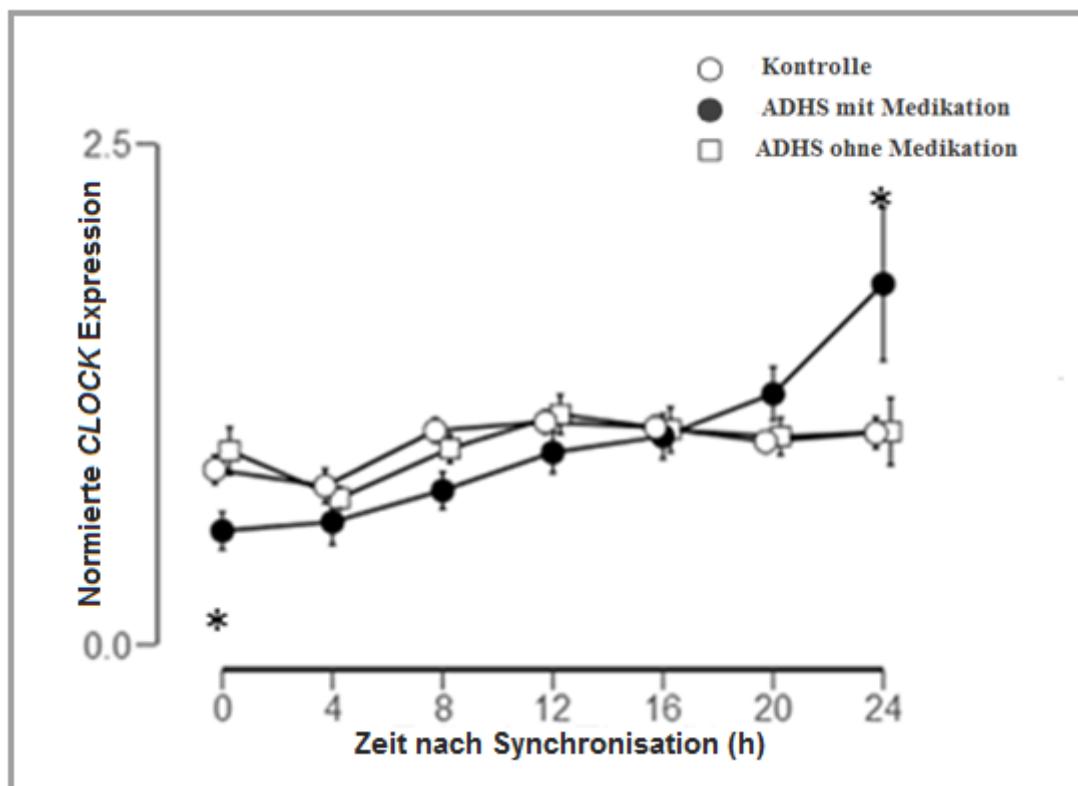
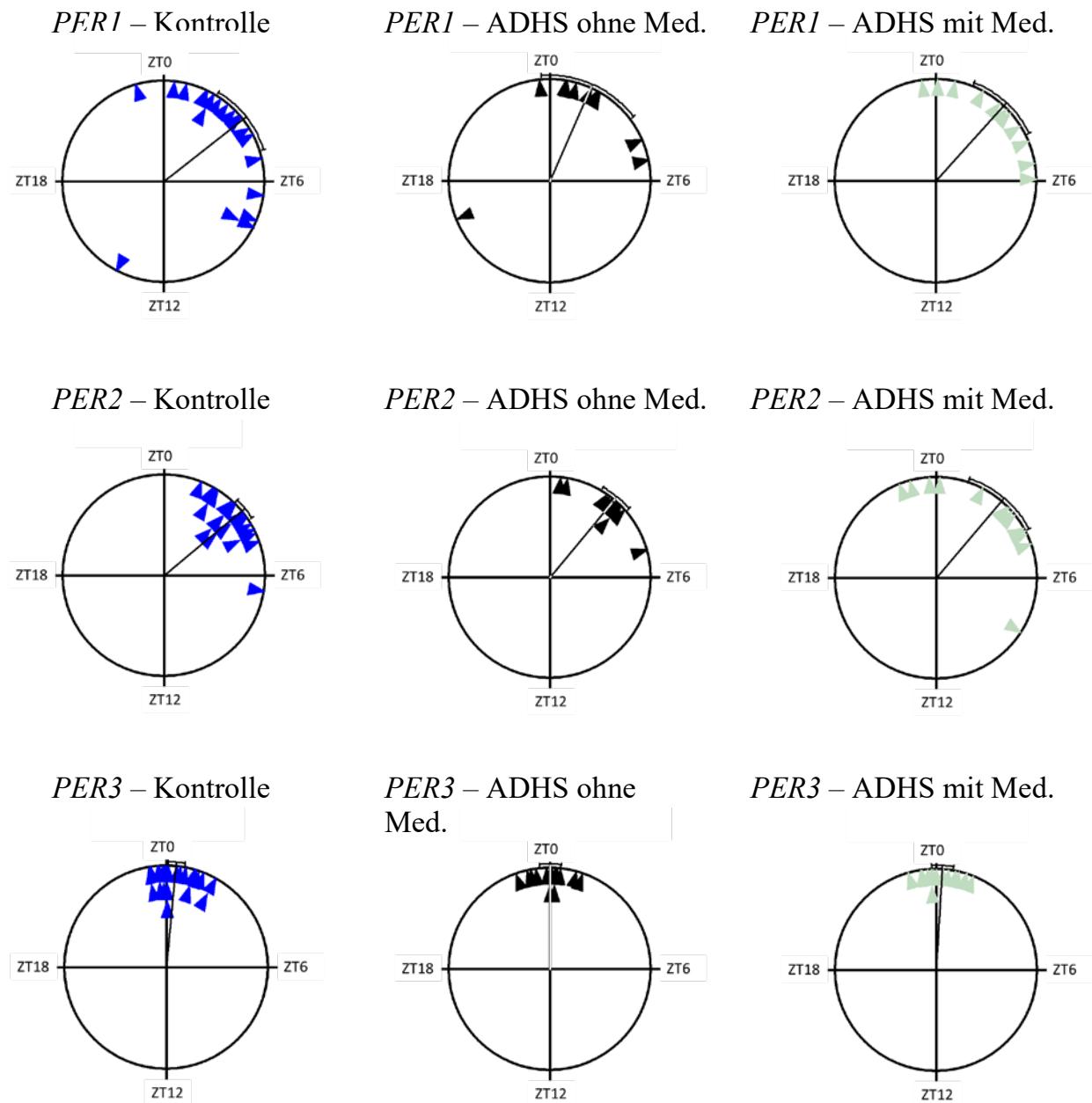
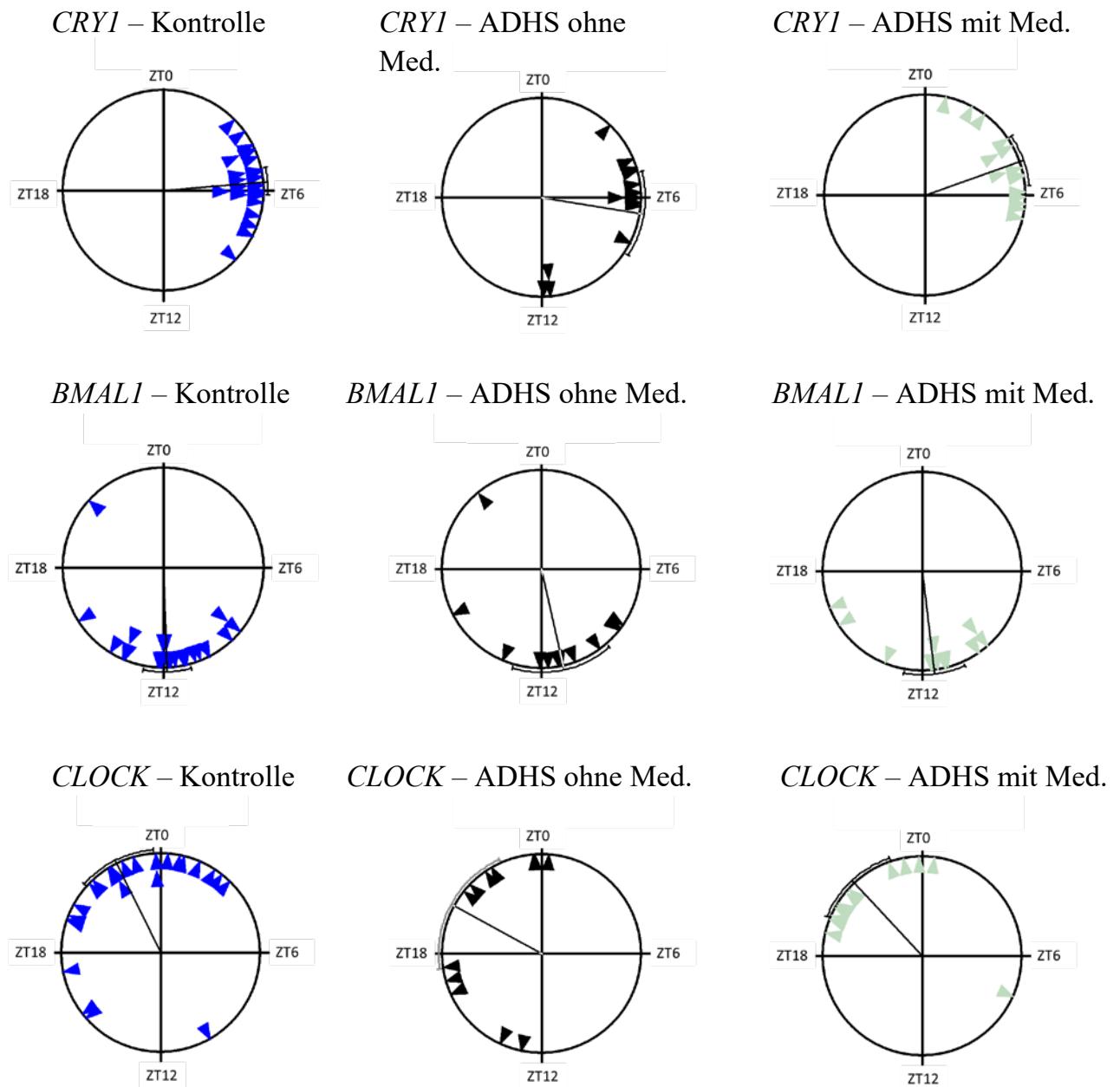


Abbildung 20: Expressionswerte von *CLOCK* im zeitlichen Verlauf nach Synchronisation, welche zum Zeitpunkt ZT0 erfolgte (\* =  $p < 0,05$ , h = Stunden).

Um Aussagen über die Phasen innerhalb der Rhythmik der Genexpression treffen zu können, wurden bei jedem Gen die entsprechenden Schwerpunkte der Kurvenverläufe mittels Cosinor-Analyse untersucht und in Rayleight-Plots aufgetragen (Abbildung 21 & 22). Ein signifikanter Unterschied war bei einem Konfidenzintervall von 95 % in der Expression von *CRY1* zwischen den Patientengruppen mit Medikation und ohne Medikation zu verzeichnen (Watson-Williams F Test,  $F_{1,27} = 4,49, p = 0,039$ ). Bei den restlichen Genexpressionswerten konnte im Vergleich der Gruppen untereinander nicht von einem signifikanten Abweichen ausgegangen werden. Lediglich die Aktivität von *CRY1* wies somit eine Phasenverschiebung auf.



*Abbildung 21:* Schwerpunkte der Kurvenverläufe für *PER1–3*, aufgetragen in Rayleigh-Plots. Abgebildet sind die jeweiligen Gene pro Versuchsgruppe. In jedem Rayleigh-Plot stellt ein Dreieck den Phasenpeak der Rhythmisik des Gens eines Probanden dar, zeigt also den Schwerpunkt des Kurvenverlaufs in Abhängigkeit von der Zeit. Der Pfeil entspricht dem Durchschnittswert der jeweiligen Gruppe. Die gebogene Linie außen am Kreis stellt das Konfidenzintervall von 95 % dar. Außen am Kreis ist zudem die Zeit nach Synchronisation aufgetragen, welche ähnlich einer Uhr gelesen werden kann (ZT0 = Zeitpunkt der Synchronisation; ZT6 = 6 Stunden nach Synchronisation; ZT12 = 12 Stunden nach Synchronisation; ZT18 = 18 Stunden nach Synchronisation). Unterschiede in den durchschnittlichen Schwerpunkten sprechen dabei für Phasenverschiebungen der Genexpression im jeweiligen Gen gegenüber den Versuchsgruppen.



*Abbildung 22:* Schwerpunkte der Kurvenverläufe für *CRYI*, *BMAL1* und *CLOCK*, aufgetragen in Rayleigh-Plots. In jedem Rayleigh-Plot stellt ein Dreieck den Phasenpeak der Rhythmisik des Gens eines Probanden dar, zeigt also den Schwerpunkt des Kurvenverlaufs in Abhängigkeit von der Zeit. Der Pfeil entspricht dem Durchschnittswert der jeweiligen Gruppe. Die gebogene Linie außen am Kreis stellt das Konfidenzintervall von 95 % dar. Außen am Kreis ist zudem die Zeit nach Synchronisation aufgetragen, welche ähnlich einer Uhr gelesen werden kann (ZT0 = Zeitpunkt der Synchronisation; ZT6 = 6 Stunden nach Synchronisation; ZT12 = 12 Stunden nach Synchronisation; ZT18 = 18 Stunden nach Synchronisation). Unterschiede in den durchschnittlichen Schwerpunkten sprechen dabei für Phasenverschiebungen der Genexpression im jeweiligen Gen gegenüber den Versuchsgruppen.

### 3.4.2 Biolumineszenz

Neben der Real-Time PCR zur Bestimmung der relativen Expression der verschiedenen Gene erfolgte die kontinuierliche Messung der Genexpression nach Transfektion des Luciferase-Gens durch einen Lentivirus. Die Aufzeichnung der Aktivität des in die Fibroblasten eingebrachten Reporter-Gens *Bmal1::luc* erfolgte gruppenweise nach Synchronisation mit Dexamethason. In Abbildung 23 ist der zeitliche Verlauf der Biolumineszenz je Gruppe aufgetragen. Die Aufzeichnung erfolgte für 96 Stunden kontinuierlich. In allen Gruppen ist eine Rhythmisierung zu erkennen, die im Verlauf abflacht. Die Analyse der Daten ergab dabei weder für die Amplitude ( $F_{2,13} = 0,038, p = 0,96$ ) noch für die Periodenlänge ( $F_{2,13} = 0,42, p = 0,66$ ) signifikante Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen.

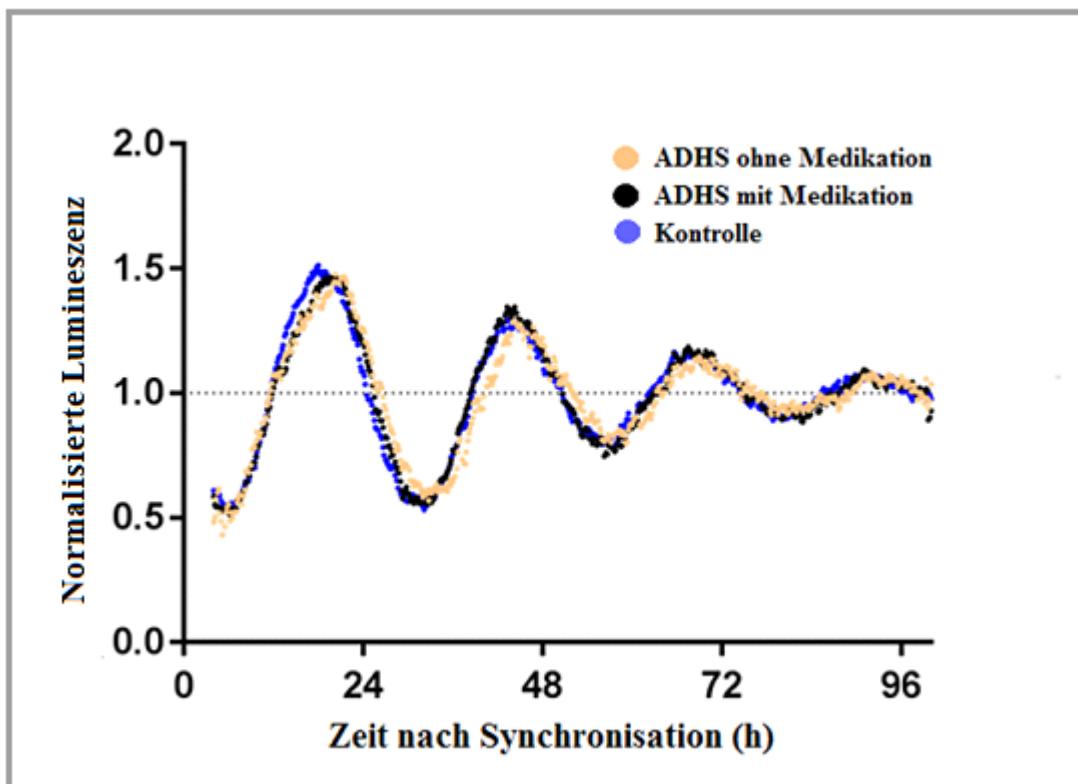
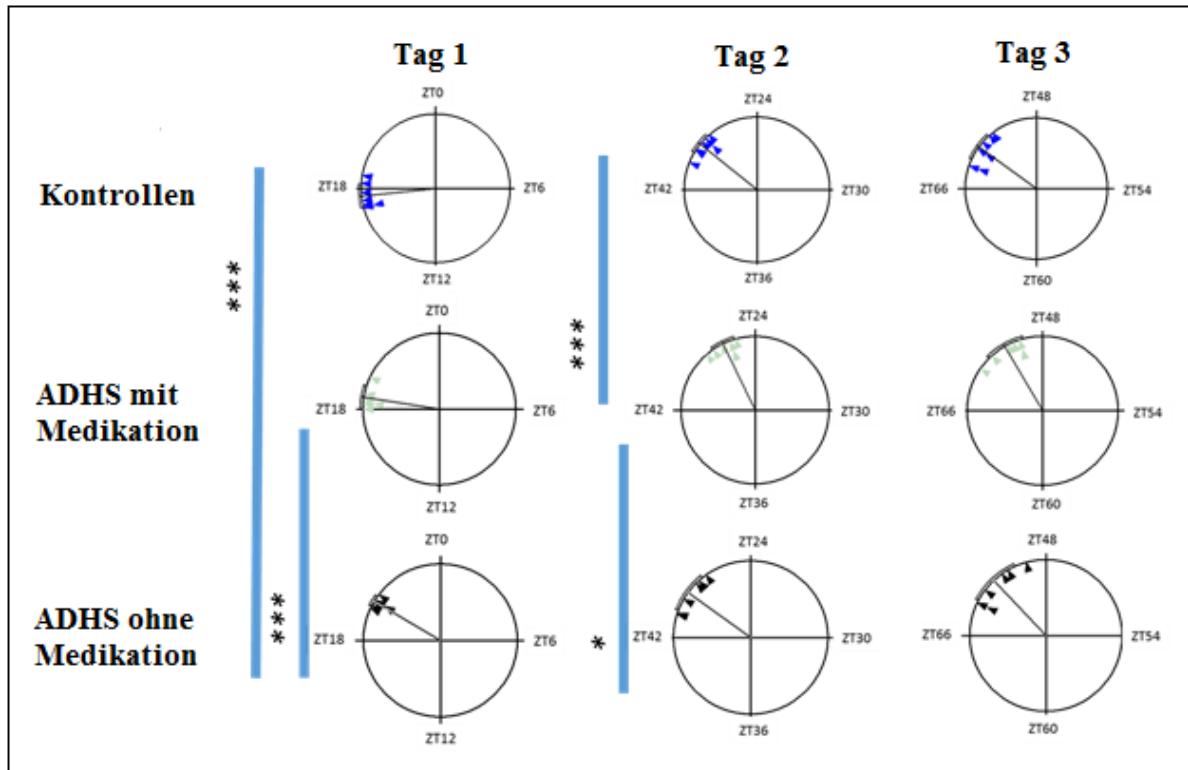


Abbildung 23: Kontinuierlich gemessene Lumineszenz im zeitlichen Verlauf nach Synchronisation zum Zeitpunkt ZT0 als Ausdruck für die Genexpression des Reporter-Gens *Bmal1::luc*. (h = Stunden).

Weiterführend wurde auch auf Phasenverschiebung untersucht. Hierbei wurde erneut die Berechnung der Schwerpunkte der Kurvenverläufe genutzt, welche in Rayleigh-Plots in Abbildung 24 dargestellt sind. Hinsichtlich des Zeitpunkts des ersten Peaks der *Bmall::luc*-Expression kann zwischen den Gruppen ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dabei erreichte die Expression in der Patientengruppe ohne ADHS-Medikation ihren Maximalwert später als in den beiden anderen Versuchsgruppen (jeweils  $p < 0,001$  nach Watson-Williams F-Test). Auch der zweite Peak, welcher am zweiten Tag nach Synchronisation auftrat, zeigte Unterschiede zwischen den Gruppen. Nun war es allerdings die Gruppe der ADHS-Patienten mit Medikation, deren Expressionswerte eine verlängerte Akrophase zeigten, wobei gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikante Verzögerung ( $p < 0,001$ ) auftrat, ebenso wie auch gegenüber der ADHS-Gruppe ohne Medikation ( $p < 0,01$ ). Am dritten Tag nach Synchronisation war zwischen den Versuchsgruppen hinsichtlich der Akrophase kein Unterschied mehr zu verzeichnen.



*Abbildung 24:* Schwerpunkte der Kurvenverläufe von *Bmall::luc* je Tag und Gruppe aufgetragen in Rayleigh-Plots. In jedem Rayleigh-Plot stellt ein Dreieck den Phasenpeak der Rhythmisik des Gens eines Probanden dar, zeigt also den Schwerpunkt des Kurvenverlaufs in Abhängigkeit von der Zeit. Der Pfeil entspricht dem Durchschnittswert der jeweiligen Gruppe. Die gebogene Linie außen am Kreis stellt das Konfidenzintervall von 95 % dar. Außen am Kreis ist zudem die Zeit nach Synchronisation aufgetragen, welche ähnlich einer Uhr gelesen werden kann (ZT0 = Zeitpunkt der Synchronisation; ZT6 = 6 Stunden nach Synchronisation; ZT12 = 12 Stunden nach Synchronisation; ZT18 = 18 Stunden nach Synchronisation). Verglichen werden die Schwerpunkte der Gruppen hinsichtlich der gemessenen Lumineszenz als Ausdruck für die Expression von *Bmall::luc* an den einzelnen Tagen der Aufzeichnung (\* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

## 4 Diskussion

Zusammengefasst ergaben die aktigraphischen Daten dieser Studie eine erhöhte nächtliche Aktivität, länger andauernde nächtliche Wachphasen und eine geringere Schlafeffizienz in der Gruppe der ADHS-Patienten mit Medikation im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen. Die Analyse der Expressionsverläufe der Clock-Gene ergab eine erhöhte Expression von *PER2* direkt nach Synchronisation sowie eine erniedrigte Expression von *CRY1* acht Stunden und einen zweiten Peak zwölf Stunden nach Synchronisation in der Patientengruppe ohne ADHS-Medikation. In der Gruppe mit ADHS-spezifischen Medikamenten konnte eine größere Amplitude der *CLOCK*-Expression als in den Vergleichsgruppen festgestellt werden. Mittels kontinuierlicher Lumineszenzmessung konnten bei der Expression von *BMAL1* Phasenverschiebungen zwischen den Versuchsgruppen nachgewiesen werden.

Die Versuchsgruppen wiesen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Alter, IQ, BMI auf, sodass eine gute Vergleichbarkeit der Gruppe angenommen werden kann. Auch psychiatrische Begleiterkrankungen waren in beiden ADHS-Gruppen vorhanden und zeigten ähnliche Verteilungsmuster. Die Subtypen der ADHS betrachtend, war ein deutliches Überwiegen des kombinierten Typs in der Gruppe mit Medikation feststellbar, wohingegen in der Patientengruppe ohne Medikation ein höherer Anteil der Probanden einen unaufmerksamen oder hyperaktiven Subtyp aufwies. Für die Verteilung der Subtypen gaben Smalley et al. (2007) für junge Erwachsene einen Anteil des hyperaktiv-impulsiven Typs mit 8 % an, 28 % der Betroffenen waren dem Mischtyp zuzuordnen und bei 64 % war von einem unaufmerksamen Typus auszugehen. Eine andere Studie über die Verteilung der Subtypen im Erwachsenenalter gibt Zahlen von 53 % bei Frauen und 48,6% bei Männern für den Mischtypen an sowie eine überwiegende Aufmerksamkeitsstörung bei Männern in 33,1 % der Fälle und bei Frauen in 40,2 %. Mit 14 % der männlichen und 11,2 % der weiblichen Betroffenen war der überwiegend hyperaktive Typus auch hierbei der seltenste Subtyp (Retz-Junginger et al. 2012). Vergleicht man die Verteilungen der Subtypen in den Gruppen dieser Studie mit den Häufigkeitsverteilungen, die Smalley et al. (2007) beschrieben haben, dann ist der unaufmerksame Subtyp zugunsten des kombinierten Typs unterrepräsentiert. In der Gruppe mit Medikation ist dieses Missverhältnis dabei stärker ausgeprägt. Im Gegensatz dazu ist die Angabe der Häufigkeiten der Subtypen nach Retz-Junginger et al. (2012), nach der im Erwachsenenalter vornehmlich der kombinierte Typ auftritt und der hyperaktiv/impulsive Subtyp am seltensten ist, übereinstimmend mit der Verteilung der ADHS-Gruppe ohne Medikation in der vorliegenden Studie. Für die medizierte ADHS-Gruppe ist jedoch auch

nach deren Erkenntnissen der Mischtyp deutlich überrepräsentiert. Unaufmerksamkeit scheint dabei assoziiert zu sein mit erhöhtem Schlafbedarf und großer Diskrepanz zwischen dem tatsächlichen Schlafbedarf und der Dauer der nächtlichen Schlafphasen, wohingegen Hyperaktivität verbunden ist mit einer im Vergleich dazu verringerten nächtlichen Schlafdauer (Gau et al. 2007). Auch im Hinblick auf die Chronotypen scheint Unaufmerksamkeit im Vergleich zu Hyperaktivität stärker mit Abendtypen einherzugehen (Caci et al. 2009).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen in der Selbsteinschätzung der tageszeitlichen Präferenzen von Aktivität und Ruhe zwischen der Gruppe der ADHS-Patienten ohne Medikamente und der Kontrollgruppe im D-MEQ-Score einen signifikanten Unterschied. In der ADHS-Gruppe besteht dabei eine Tendenz zum Abendtyp, wie es bei ADHS-Patienten bereits in einer Vielzahl von Studien beschrieben wurde (Rybak et al. 2007; Voinescu et al. 2012; Bijlenga et al. 2013b; Coogan & McGowan 2017). Die ADHS-Patientengruppe mit Medikation zeigte jedoch weder gegenüber der Kontrollgruppe signifikante Unterschiede, noch gegenüber der ADHS-Gruppe ohne Medikation. Die Ergebnisse des D-MEQ deuten darauf hin, dass mit Einnahme der ADHS-Medikamente eine Änderung der circadianen Präferenzen einhergeht, wobei insbesondere eine Verschiebung zu früheren Tageszeiten auftritt. Jedoch könnte diese Verschiebung nicht nur durch die Medikation und dadurch hervorgerufene tiefgreifende physiologische Veränderungen verursacht sein, sondern auch Ausdruck der Unterrepräsentation des unaufmerksamen Subtyps sein, welcher in der Patientengruppe mit Medikation deutlich häufiger vertreten war. Hinsichtlich der Symptomausprägung war zwischen beiden Patientengruppen in den letzten sechs Monaten vor Studienteilnahme kein signifikanter Unterschied in der Selbstbeurteilung feststellbar. Inwieweit eine Veränderung der Art oder der Stärke der ADHS-Symptome durch Einnahme der spezifischen Medikation bei den einzelnen teilnehmenden Patienten eingetreten ist, wurde in dieser Studie nicht erfasst und kann nur spekuliert werden. Eine vergleichbare Symptomschwere bestärkt die Vermutung, dass die gefundenen, differenten Ergebnisse beider Patientengruppen in Aktigraphie und Analyse der Clock-Gene nicht nur durch die Symptome der Erkrankung selbst zu begründen sind.

In den aktigraphischen Messungen wurden Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet, wobei sich vor allem die Ergebnisse der ADHS-Patientengruppe mit Medikation von denen der anderen Gruppen unterschieden. So konnte bei Einnahme der Medikation eine Abnahme der RA festgestellt werden. Der Unterschied hinsichtlich der Aktivität zwischen Tag und Nacht reduzierte sich dementsprechend. Zwischen der ADHS-Gruppe ohne Medikation und

der Kontrollgruppe war im Hinblick auf die RA kein signifikanter Unterschied feststellbar. In der Patientengruppe mit Medikation war auch die L5 erhöht. Die Abnahme der RA in dieser Gruppe scheint daher eher durch eine Zunahme der nächtlichen Aktivität verursacht zu sein, als durch eine Abnahme der Aktivität am Tag. Die IS wies keine signifikanten Unterschiede auf. Es kann daher angenommen werden, dass die Aktivitätswerte der einzelnen Tage der Aufzeichnung innerhalb der Gruppen ähnlich variierten. Die Synchronisation an äußere Zeitgeber scheint also beim Probandenkollektiv in allen Gruppen gleichermaßen stabil zu sein. Im Gegensatz dazu fanden Boonstra et al. (2007) allerdings eine verringerte RA auch bei medikamenten-naiven ADHS-Patienten sowie eine erhöhte IS. Die Werte der IV in der vorliegenden Studie waren in der Gruppe der ADHS-Patienten ohne Medikation im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert, wohingegen die Gruppe mit entsprechenden Medikamenten keine signifikanten Unterschiede der IV gegenüber beiden anderen Gruppen aufwies. Dies spricht für eine Abnahme der Störungen in der circadianen Rhythmik in der nicht-medizierten Patientengruppe und deckt sich mit den Ergebnissen von Boonstra et al. (2007). Dem gegenüber war zwischen der Kontrollgruppe und der ADHS-Gruppe ohne Medikamente hinsichtlich L5 und Schlafeffizienz kein Unterschied nachweisbar. Mittels Aktigraphie konnte auch nachgewiesen werden, dass die Zeit, die nach dem initialen Einschlafen wach verbracht wurde, in der Gruppe der Patienten ohne Medikation und in der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede zueinander aufwiesen, wohl aber die Patientengruppe mit Medikation im Vergleich zu beiden anderen Versuchsgruppen eine Steigerung der nächtlichen Zeit in wachem Zustand aufwies. Zwar war dies nicht durch eine größere Anzahl von nächtlichen Wachphasen zu erklären, jedoch war feststellbar, dass bei Patienten mit Medikation die einzelnen Episoden länger andauerten. Die Ergebnisse von Boonstra et al. (2007) zeigten zwischen der Gruppe der Patienten ohne Medikation und der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Dauer oder Anzahl der nächtlichen Wachphasen, was sich mit den Daten der vorliegenden Studie deckt. Nach Gabe von Methylphenidat kam es zu einer Verlängerung der Einschlafzeit und einer Reduktion der absoluten Schlafzeit. Entgegen den hier vorliegenden Ergebnissen zeigten sich die Anzahl und die Dauer der nächtlichen Wachphasen bei Boonstra et al. (2007) nach Einnahme von Methylphenidat reduziert, wodurch die Dauer der ungestörten Schlafphasen zunahm. Eine mögliche Ursache hierfür mag der Unterschied im Studiendesign sein. Im Gegensatz zur vorliegenden Studie erfolgte bei Boonstra et al. (2007) zunächst eine Aufzeichnung der Aktivität am Tag und in der Nacht mittels Actiwatch bei gesunden Kontrollen und medikamenten-naiven ADHS-Patienten, anschließend eine randomisierte und verblindete

Gabe von Methylphenidat unabhängig von der vorliegenden Symptomlast der ADHS und der Schwere von Schlafstörungen. Im Gegensatz dazu erfolgte in der vorliegenden Studie die Zuordnung zu den Patientengruppen und die damit einhergehende Einnahme der Medikamente nicht zufällig. Stattdessen wurde die ADHS-Therapie der Patienten individuell, im Vorfeld der Studie, im klinischen Setting entsprechend der Symptomschwere und eventuell bestehender Komorbiditäten gewählt. Die Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen von randomisierten Studien ist daher eingeschränkt. Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte ebenfalls bedacht werden, dass die Aktigraphie zwar durch eine hohe Sensitivität gekennzeichnet ist (Morgenthaler et al. 2007), jedoch eine reduzierte Genauigkeit bei der Erkennung nächtlicher Wachphasen im Vergleich zur PSG aufweist, die je nach Schlafstadium im EEG eine Zuordnung der Schlaf- und Wachphasen erlaubt (Ancoli-Israel et al. 2003). Bei der Aktigraphie wird im Allgemeinen der Schlaf überschätzt und die Wachphasen unterschätzt (Sadeh 2011). Auch durch diese eingeschränkte Fähigkeit zur korrekten Darstellung der nächtlichen Schlafunterbrechung können die unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich der Wachphasen in der Nacht erklärt werden. Für die in dieser Studie untersuchte Frage nach Veränderungen in der circadianen Rhythmik des Schlafs ist die Aktigraphie jedoch gut geeignet, da Nacht-zu-Nacht-Instabilitäten gut abgebildet und rhythmische Aktivitätsmuster über einen längeren Zeitraum aufgezeichnet werden können. So können auch Aussagen über den circadianen Rhythmus getroffen und Auswirkungen von Therapien auf die Phasen von Schlaf und Aktivität beurteilt werden (Ancoli-Israel et al. 2003; Sadeh 2011). Zur Validierung der Daten, die in der vorliegenden Studie durch Aktigraphie gewonnen wurden, wäre die zusätzliche Anfertigung von Schlaftagebüchern parallel zum Tragen der Actiwatch möglich, jedoch nicht erforderlich für die Fragestellung der Studie. Hier war vielmehr die Einschätzung über das circadiane Verhalten der Probanden entscheidend als die eigentlichen Parameter des Schlafs selbst. Um Aussagen über die Parameter der Schlafqualität zu treffen, ist die PSG mit Aufzeichnung eines EEGs der Aktigraphie deutlich überlegen. Mittels PSG könnten zudem weitere Schlafstörungen, auch in der Kontrollgruppe, sicherer aufgezeigt beziehungsweise ausgeschlossen werden (Ancoli-Israel et al. 2003).

Die in der Aktigraphie gefundenen Unterschiede bestehen nicht hauptsächlich zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen, sondern insbesondere zwischen der Patientengruppe mit Medikation und beiden anderen Versuchsgruppen. Dies legt die Vermutung nahe, dass die gefundenen Veränderungen der Schlafmerkmale zwischen den Gruppen neben dem Vorhandensein von ADHS auch durch den Medikamentenstatus zustande

kommen könnten. Aufgrund des naturalistischen, nicht randomisierten Studiendesigns sind die durch die Ergebnisse der Studie zu vermutenden Auswirkungen der Medikamente jedoch mit Vorsicht zu interpretieren. Zwar lassen sich die Ergebnisse mit der Datenlage vieler Studien vereinen, eine weiterführende Untersuchung mit verändertem Versuchsaufbau und ableitbaren Parametern vor und nach Medikamentengabe bei den einzelnen Probanden wäre jedoch wünschenswert, um eindeutigere Aussagen treffen zu können.

Tatsächlich konnten mehrere Studien über das Schlafverhalten unter Methylphenidat und Atomoxetin ebenfalls einen deutlichen Einfluss der Medikamente auf den Schlaf aufzeigen, wobei insbesondere die Reduktion der absoluten Schlafzeit als auch eine Zunahme der nächtlichen Wachphasen und der Zeit bis zum Einschlafen wiederholt nachgewiesen wurden. (Sangal et al. 2006; Corkum et al. 2008; Ironside et al. 2010; Antle et al. 2012; Hvolby 2015). Die genannten Studien bestärken damit die Erkenntnisse der vorliegenden Studie hinsichtlich der Auswirkungen der Medikation auf die Ergebnisse der Aktigraphie. Sangal et al. (2007) kamen zu dem Ergebnis, dass die Auswirkungen auf den Schlaf durch Methylphenidat stärker sind als die durch Atomoxetin hervorgerufenen Schlafveränderungen. Hinsichtlich des Medikaments wurde allerdings in der vorliegenden Studie nicht weiter unterschieden. Die Probanden, die Methylphenidat einnahmen, waren jedoch in dieser Studie zahlenmäßig stärker vertreten. Somit ist der Effekt, den Methylphenidat auf den Schlaf hat, vermutlich stärker abgebildet. Um den Einfluss der Medikamente gesondert voneinander zu untersuchen, wären weiterführende Studien mit größeren Probandenzahlen je Medikament nötig.

Anhand der Ergebnisse dieser Studie kann ein Einfluss der zur Therapie der ADHS eingesetzten Medikation auf die circadiane Rhythmisik in Betracht gezogen werden. Zu dieser Vermutung passend konnte auch in früheren Studien an gesunden Nagetieren eine Phasenverschiebung und eine Abnahme der Variabilität der Aktivitätsverteilungen im Tagesverlauf durch die Gabe der ADHS-Medikation ausgelöst werden (Antle et al. 20012; O'Keeffe et al. 2012). Außerdem führte die Einnahme von Methylphenidat zu einer erhöhten Amplitude der elektrischen Impulse im SCN gesunder Mäuse (Antle et al. 2012). Dies unterstützt die Ergebnisse der vorliegenden Studie dahingehend, dass die medikamentöse Therapie der ADHS eine agravierende Wirkung auf die Schlafstörungen der Patienten haben kann und die Einnahme selbst auch zu Veränderungen der Schlafdauer und Schlafarchitektur führen kann. Die Erkenntnis, dass sowohl die Erkrankung ADHS als auch die zur Therapie eingesetzte Medikation selbst sich auf die grundlegenden circadianen Prozesse des Körpers auswirken könnten, unterstreicht die Wichtigkeit der Untersuchung der einzelnen Clock-Gene.

Bei der Analyse der Clock-Gene konnten in der RT-PCR signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen für die Expressionsmuster der Gene *PER2*, *CRY1* und *CLOCK* nachweisen werden, für *PER1*, *PER3* und *BMAL1* hingegen nicht. Dass nicht alle Clock-Gene gleichermaßen durch Methylphenidat und Atomoxetin beeinflusst werden, deckt sich mit den Erkenntnissen von Baird et al. (2013), die die Auswirkungen von Methylphenidat und Atomoxetin in verschiedenen Hirnregionen von Mäusen untersuchten. Es zeigte sich, dass die Expression von einzelnen Clock-Genen im SCN und in anderen Hirnarealen, wie den paraventrikulären Kernen, durch Gabe von Atomoxetin und Methylphenidat verändert sind. Hervorzuheben dabei ist, dass im Hauptschrittmacher in den Mäusehirnen durch Atomoxetin die rhythmische Expression von *PER2* aufgehoben, und durch Methylphenidat die Akrophase vorverlegt wurde. *CLOCK* und *PER1* dagegen waren bei Baird et al. (2013) im SCN durch Medikation nicht verändert, was sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie vereinen lässt. Unter Einnahme von Atomoxetin konnte eine veränderte *CLOCK*-Expression im SCN in Abhängigkeit von der Belichtungssituation nachgewiesen werden, gleichzeitig waren dabei die *BMAL1* und *PER2* Expression jedoch unverändert (O'Keeffe et al. 2012). Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass es in der Medikamentengruppe in der Expression von *CRY1* zu einer Phasenverschiebung kam, die dazu führte, dass sich die Akrophase der ADHS-Patienten mit Medikation so verschob, dass es zu einer zeitlichen Annäherung an die Akrophase der *CRY1*-Genexpression der Kontrollgruppe kam. Ähnliches war bei der kontinuierlichen Aufzeichnung der Aktivität von *BMAL1* feststellbar. Hier trat der Peak am ersten Tag der Messung in der Gruppe ohne Medikation deutlich nach den Peaks der Kontrollgruppe und der Gruppe mit Medikation auf. Auch dabei näherte sich das Expressionsmuster, genauer gesagt die Akrophase, in der medizierten Gruppe dem Verlauf der Kontrollgruppe an. In der Patientengruppe mit Einnahme von ADHS-spezifischen Medikamenten kam es zwar zu einer Zunahme von Schlafveränderungen wie SOI und längeren nächtlichen Wachphasen, aber auch zu einer Beeinflussung der Expression der Clock-Gene mit teilweise angleichendem Charakter an die Kontrollgruppe. Durch Phasenverschiebung bei zentralen Genen der circadianen Rhythmus ist nachfolgend auch eine Verschiebung der Aktivitäts- und Ruhephasen zu erwarten, was sich in einer Umverteilung der Chronotypen zeigen würde. Die Auswertung des D-MEQ in der vorliegenden Studie hat diese Vermutung bestätigt und ist daher gut mit den Phasenverschiebungen von *BMAL1* und *CRY1* vereinbar.

Patienten mit späten Chronotypen sind im Allgemeinen abends aktiver und haben vermehrt Schlafprobleme. Soziale Gegebenheiten verlangen allerdings meist frühes Aufstehen, sodass Schlafmangel und Tagesmüdigkeit entstehen (Kooij 2007). Im Hinblick auf die ADHS-

Symptomatik konnte nachgewiesen werden, dass späte Chronotypen nicht nur mit dem Vorliegen von ADHS assoziiert sind, sondern auch, dass die Symptome umso stärker ausgeprägt sind, je später der Chronotyp ist (Rybak et al. 2007). Kommt es zu einer starken Diskrepanz zwischen innerer Rhythmik und äußeren Einflüssen durch Zeitgeber, ist die Synchronisation gestört und es resultiert sozialer Jetlag. Dabei stellt sozialer Jetlag sogar einen Prädiktor für die Symptomschwere von ADHS dar: Je stärker der soziale Jetlag, desto ausgeprägter die ADHS-Symptomatik (McGowan et al. 2016). Aufgrund des deutlichen Zusammenhangs zwischen späten Chronotypen, sozialem Jetlag und ADHS gibt es Hypothesen, die verspätete endogene circadiane Rhythmen als Auslöser für spät auftretende Formen der ADHS sehen (Lunsford-Avery & Kollins 2018). Geht man davon aus, dass die endogenen Rhythmen unter Einnahme von Methylphenidat oder Atomoxetin eher denen eines Normaltyps anstatt eines Abendtyps entsprechen, kann auch die Anpassung an soziale Gegebenheiten besser erfolgen. Der soziale Jetlag würde dadurch ebenso reduziert werden, wie auch Schlafmangel und Tagesmüdigkeit. Für ADHS-Patienten würde das auch eine Reduktion der Symptomatik bedeuten. Eine durch Methylphenidat und Atomoxetin ausgelöste Veränderung der endogenen Rhythmik und damit des Chronotyps könnte so die Wirkweise der Medikation erklären. Immerhin erscheint die reine Beeinflussung des Schlafs hierfür nicht plausibel, da die Medikamente den Schlaf selbst nicht verbessern, was sowohl die aktigraphischen Ergebnisse dieser Studie, als auch die Ergebnisse anderer Studien zeigten (Sangal et al. 2006; Boonstra et al. 2007; Corkum et al. 2008; Ironside et al. 2010; Antle et al. 2012; Hvolby 2015). Wäre die Besserung der Symptomatik unter Methylphenidat und Atomoxetin durch Reduktion des sozialen Jetlags zu erklären, dann könnten eventuell auch Lichttherapie oder Melatonin als Therapieoptionen von ADHS in Betracht gezogen werden, wie Lunsford-Avery & Kollins (2018) ebenfalls diskutierten, um die Synchronisation innerer und äußerer Schrittmacher zu verbessern.

Dass die Verschiebung der Akrophase in der RT-PCR für BMAL1 nicht festgestellt wurde, kann an der unterschiedlichen Art der Aufzeichnung liegen. Für die RT-PCR erfolgte die Messung alle vier Stunden nach Synchronisation, bei der Messung der BMAL1-Biolumineszens im Gegensatz dazu aber kontinuierlich. Die Aufzeichnung durch die RT-PCR ist damit hinsichtlich der exakten Akrophase deutlich ungenauer als die Biolumineszenzmessung. Bei Verkleinerung der Messabstände wäre die Phasenverschiebung möglicherweise auch in der RT-PCR nachweisbar. *BMAL1* stellt eines der Hauptgene in der Regulation der circadianen Rhythmik dar. Bei einer Phasenverschiebung in diesem Gen ist nachfolgend eine Veränderung in den weiteren Genen der nachgeschalteten

Rückkopplungsschleifen zu erwarten. Dass lediglich für *CRY1* ebenfalls eine Phasenverschiebung nachweisbar war, kann möglicherweise daran liegen, dass auch die Expressionsverläufe der weiteren Gene zu groß gewählt wurden. Mit kleineren Messintervallen könnte diesbezüglich mehr Sicherheit erlangt und eventuell weitere Erkenntnisse gewonnen werden. Ein anderer Erklärungsansatz dafür, dass die gefundenen Unterschiede jeweils nur in einigen Genen messbar waren, geben die Ergebnisse von Ono et al. (2017). Sie untersuchten die Phasenverläufe der Genexpression von *PER1* und *BMAL1* mit kontinuierlicher Lumineszenzmessung, wie es auch in der vorliegenden Studie für *BMAL1* erfolgte. Bei deutlicher Störung der circadianen Rhythmik durch äußere Einflüsse kam es zu Phasenverschiebungen *in vivo*. Daraus resultierend war eine Art Entkopplung der Expression beider Gene feststellbar, bei der *BMAL1* eine deutlich verkürzte Periodenlänge im Vergleich zu *PER1* hatte. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Rückkopplungsschleifen der circadianen Rhythmik zwar miteinander in Verbindung stehen, jedoch eher als eigenständige Schleifen angesehen werden müssen, die selbständig oszillieren und in unterschiedlichem Ausmaß auf externe Stimuli reagieren (Ono et al. 2017).

Im vorliegenden Studienprotokoll wurde aufgrund des naturalistischen Charakters der Studie weder näher aufgeführt, wie hoch die Dosis der Medikamente war, noch zu welcher Tageszeit sie verabreicht wurden. Auch sind keine Angaben vorliegend, seit wann beziehungsweise wie lange vor Studienteilnahme mit der Medikation begonnen wurde. Diese Punkte sind jedoch bei der Interpretation der Ergebnisse zu beachten, worauf die im Folgenden genannten Studien hinweisen. Untersuchungen zeigten, dass es durch die Gabe von Stimulanzien am Abend zu einer Verzögerung des Einschlafens kommen kann. Gaben am Morgen haben dagegen einen geringeren Effekt auf das Schlafverhalten (Fargason et al. 2013). Zhang et al. (2014) kamen zu dem Ergebnis, dass circadiane Gene mehr Regulationsmöglichkeiten zu haben scheinen als andere Gene, was am ehesten durch je nach Organ stark variierenden Spliceformen verursacht wird. In unterschiedlichen Organen können dabei auch Phasenverschiebungen von mehr als sechs Stunden und gegenläufige Phasenverläufe auftreten, gleichzeitig oszillieren die zentralen Schrittmacher aber synchron. Je nach Wirkziel und Halbwertszeit (HWZ) eines Medikaments ist deshalb eine variierende Wirksamkeit je nach Einnahmezeitpunkt möglich (Zhang et al. 2014). Dabei ist eine schwankende Wirksamkeit umso wahrscheinlicher, je kürzer die HWZ eines Medikaments ist (Ruben et al. 2019). Eine kurze HWZ von weniger als sechs Stunden haben auch Atomoxetin (2 – 5 h) und Methylphenidat (2 – 4 h) (Benkert & Hippius 2017). Die Wirksamkeit der zur ADHS-Therapie eingesetzten Medikamente könnte daher je nach Einnahmezeitpunkt variieren.

Aufgrund von möglichen interindividuellen Unterschieden in den Phasenverläufen der circadianen Genproduktion kann die Wirkung allerdings auch bei gleichen Einnahmezeitpunkten zwischen Patienten unterschiedlich ausfallen (Zhang et al. 2014).

Dass auch die Dosis der Medikamente einen großen Einfluss auf die Qualität der Schlafstörungen hat, konnten Lee et al. (2011b) nachweisen. Im Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass niedrige und moderate Dosen von Methylphenidat vor allem mit einer Erhöhung von MESOR und Amplitude einhergehen. Bei hohen Dosen kam es zusätzlich zu einer Zunahme der Periodenlänge, was für einen weitreichenden Einfluss auf circadiane Prozesse spricht (Lee et al. 2011b). Zwar scheint nach Beendigung der Zufuhr von Methylphenidat die Aktivitätsverteilung im Nagetiermodell schnell wieder zum ursprünglichen Muster zurückzukehren (Antle et al. 2012), jedoch gab es auch Hinweise darauf, dass mit größerer Dosis der Medikation auch langfristigere Veränderungen auftraten (Algahim et al. 2009; Lee et al. 2011b). Sowohl Lee et al. (2011b) als auch Antle et al. (2012) konnten bei hohen Dosen eine Zunahme der Periodenlänge der circadianen Rhythmik feststellen. Antle et al. (2012) untersuchten in diesem Zusammenhang elektrische Impulse im SCN, wobei durch Methylphenidat hinsichtlich der Signale eine erhöhte Amplitude und eine Abnahme der Variabilität auftraten. Lee et al. (2011b) führten die Veränderungen der Periodenlänge vor allem auf die unterschiedliche Rezeptorbesetzung der Hirnareale zurück. Während Methylphenidat eine höhere Affinität zu D2-Rezeptoren hat, liegen im SCN vorrangig D1-Rezeptoren vor. Bei hohen Dosen des Medikaments werden neben den D2-Rezeptoren der anderen Hirnbereiche allerdings auch die D1-Rezeptoren zunehmend aktiviert, wodurch langfristige Effekte auf die circadiane Rhythmik zustande kommen (Lee et al. 2011b).

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist weiterhin zu bedenken, dass die entnommenen Fibroblasten losgelöst sind von den anderen äußeren und inneren Stimuli, denen sie im Körper ausgesetzt sind, und damit auch keine weiteren Signale anderer circadianer Schrittmacher oder Zeitgeber mehr erhalten. Eine Aussage über die molekularen Mechanismen des intrinsischen circadianen Rhythmus der Zelle scheint hierdurch gut möglich zu sein. Im Vergleich dazu sind die Daten von Actiwatch und D-MEQ von einer Vielzahl von Stimuli beeinflusst und in Zusammenschau mit weiteren physiologischen Prozessen des Körpers zu werten (Hida et al. 2017). Es ist bekannt, dass ADHS selbst eine genetische Komponente hat, sodass Unterschiede in der Geneexpression nicht allzu überraschend sind im Hinblick auf die große Anzahl von Patienten mit ADHS, die unter Schlafstörungen leiden. Die Feststellung, dass nun allerdings nicht nur zwischen Patienten und Kontrollen, sondern auch zwischen den beiden Patientengruppen signifikante

Unterschiede in der Expression der Clock-Gene in den Fibroblasten nachweisbar waren, lässt vermuten, dass auch die Gene, die für die circadiane Rhythmik verantwortlich sind, zwischen den beiden Patientengruppen molekulare Veränderungen aufweisen könnten. Immerhin lagen zwischen Entnahme der Fibroblasten und Messung der Werte Wochen, in denen regelmäßig ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte, in denen keine Medikamente zugeführt wurden und in denen die Fibroblasten ohne zusätzliche Impulse höhergelegener Schrittmacher ihrem eigenen endogenen Rhythmus folgten. Daraus ergibt sich die Annahme, dass es einen dauerhaften Effekt der ADHS-Medikation auf die Clock-Gene selbst geben könnte. Ein möglicher Regulationspunkt der Medikation an der Genaktivität wäre die Methylierung, welche maßgeblich Transkription und Translation beeinflusst und sich epigenetisch auswirkt. Dass Methylphenidat die Methylierung der DNA verändert und sich damit langfristig auf die Aktivität einzelner Gene auswirkt, wurde durch Csoka und Szyf (2009) beschrieben. Auch die Sensibilität für Methylphenidat am Dopamintransporter DAT1 ist je nach Methylierung der DNA unterschiedlich (Ding et al. 2007). Epigenetische Einflüsse wären somit nicht nur im Hinblick auf die langfristigen Folgen der Medikamenteneinnahme zu bedenken, sondern könnten auch eine Rolle bei der Wirksamkeit der Medikation spielen.

Sowohl die Erkrankung selbst, als auch der Medikamentenstatus erscheinen anhand der aktuellen Datenlage relevant im Hinblick auf Schlafstörungen und Veränderungen der circadianen Rhythmik. In Anbetracht der kurzen HWZ von Atomoxetin und Methylphenidat könnte eine Anpassung des Dosierschemas anhand der circadianen Rhythmik des jeweiligen Patienten dazu beitragen, eine optimale Wirksamkeit bei möglicherweise gleichzeitiger Reduktion der Nebenwirkungen zu erreichen (Zhang et al. 2014). Auch weiterführende Untersuchungen der circadianen Prozesse am Fibroblastenmodell erscheinen hierbei aufgrund fehlender Einflüsse durch circadiane Störfaktoren als Alternative zu in vivo Untersuchungen vielversprechend (Ruben et al. 2019). Aus diesem Grund wäre es empfehlenswert, zukünftig bei der Behandlung der ADHS die Ergebnisse unter anderem dieser Studie zu berücksichtigen, um die Therapie auch im Hinblick auf circadiane Aktivitätsmuster und Schlafstörungen zu optimieren und neue Therapieansätze in Betracht zu ziehen. Des Weiteren wäre für zukünftige Studien interessant zu untersuchen, inwieweit diese Veränderungen reversibel sind und ob auch beim Menschen dosisabhängige Unterschiede auftreten wie im Nagetiermodell. Letztendlich kann ein besseres Verständnis der Medikamentenwirkung auf die vielfältigen circadianen Prozesse, zu dem auch die vorliegende Studie einen Beitrag leistet, zu einem kritischen Einsatz der Medikamente beitragen, eventuelle Nebenwirkungen besser vorhersagen und so den Nutzen der Medikation für betroffene Patienten erhöhen.

## 5 Literaturverzeichnis

- Albrecht, U. (2012):** Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. In: *Neuron* 74 (2), S. 246–260. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.04.006.
- Algahim, M. F.; Yang, P. B.; Wilcox, V. T.; Bureau, K. D.; Swann, A. C.; Dafny, N. (2009):** Prolonged methylphenidate treatment alters the behavioral diurnal activity pattern of adult male Sprague-Dawley rats. In: *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 92 (1), S. 93–99. DOI: 10.1016/j.pbb.2008.10.021.
- Alwis, D. de; Tandon, M.; Tillman, R.; Luby, J. (2015):** Nonverbal Reasoning in Preschool Children: Investigating the Putative Risk of Secondhand Smoke Exposure and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder as a Mediator. In: *Scandinavian journal of child and adolescent psychiatry and psychology* 3 (2), S. 115–125. DOI: 10.21307/sjcapp-2015-012.
- American Psychiatric Association (2013):** DSM-V: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5th Edition. Attention deficit hyperactivity disorder.
- Ancoli-Israel, S.; Cole, R.; Alessi, C.; Chambers, M.; Moorcroft, W.; Pollak, C. P. (2003):** The role of actigraphy in the study of sleep and circadian rhythms. In: *Sleep* 26 (3), S. 342–392. DOI: 10.1093/sleep/26.3.342.
- Antle, M. C.; van Diepen, H. C.; Deboer, T.; Pedram, P.; Pereira, R. R.; Meijer, J. H. (2012):** Methylphenidate modifies the motion of the circadian clock. In: *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 37 (11), S. 2446–2455. DOI: 10.1038/npp.2012.103.
- Arendt, J. (2000):** The Pineal Gland and Pineal Tumours. Endotext. In: L. J. de Groot, P. Beck-Peccoz, G. Chrousos et al. (Hrsg.).
- Aschoff, J.; Fatranská, M.; Giedke, H.; Doerr, P.; Stamm, D.; Wisser, H. (1971):** Human circadian rhythms in continuous darkness: entrainment by social cues. In: *Science (New York, N.Y.)* 171 (3967), S. 213–215. DOI: 10.1126/science.171.3967.213.
- Auburger, G.; Klinkenberg, M.; Drost, J.; Marcus, K.; Morales-Gordo, B.; Kunz, W. S. et al. (2012):** Primary skin fibroblasts as a model of Parkinson's disease. In: *Molecular neurobiology* 46 (1), S. 20–27. DOI: 10.1007/s12035-012-8245-1.

**Axelsson, J.; Kecklund, G.; Akerstedt, T.; Donofrio, P.; Lekander, M.; Ingre, M. (2008):** Sleepiness and performance in response to repeated sleep restriction and subsequent recovery during semi-laboratory conditions. In: *Chronobiology international* 25 (2), S. 297–308. DOI: 10.1080/07420520802107031.

**Baird, A. L.; Coogan, A. N.; Siddiqui, A.; Donev, R. M.; Thome, J. (2012):** Adult attention-deficit hyperactivity disorder is associated with alterations in circadian rhythms at the behavioural, endocrine and molecular levels. In: *Molecular psychiatry* 17 (10), S. 988–995. DOI: 10.1038/mp.2011.149.

**Baird, A. L.; Coogan, A. N.; Kaufling, J.; Barrot, M.; Thome, J. (2013):** Daily methylphenidate and atomoxetine treatment impacts on clock gene protein expression in the mouse brain. In: *Brain research* 1513, S. 61–71. DOI: 10.1016/j.brainres.2013.03.038.

**Balsalobre, A.; Brown, S. A.; Marcacci, L.; Tronche, F.; Kellendonk, C.; Reichardt, H. M. et al. (2000):** Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. In: *Science (New York, N.Y.)* 289 (5488), S. 2344–2347. DOI: 10.1126/science.289.5488.2344.

**Barion, A.; Zee, P. C. (2007):** A clinical approach to circadian rhythm sleep disorders. In: *Sleep medicine* 8 (6), S. 566–577. DOI: 10.1016/j.sleep.2006.11.017.

**Barrett, R. K.; Takahashi, J. S. (1995):** Temperature compensation and temperature entrainment of the chick pineal cell circadian clock. In: *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 15 (8), S. 5681–5692. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.15-08-05681.1995.

**Becker, S. P.; Langberg, J. M.; Evans, S. W. (2014):** Sleep problems predict comorbid externalizing behaviors and depression in young adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. In: *European child & adolescent psychiatry* 24 (8), S. 897–907. DOI: 10.1007/s00787-014-0636-6.

**Benkert, O.; Hippius, H. (Hrsg.) (2017):** Kompendium der Psychiatrischen Pharmakotherapie. 11. Auflage. Berlin: Springer.

**Bijlenga, D.; Van Someren, E. J. W.; Gruber, R.; Bron, T. I.; Kruithof, I. F.; Spanbroek, E. C. A.; Kooij, J. J. S. (2013a):** Body temperature, activity and melatonin profiles in adults

with attention-deficit/hyperactivity disorder and delayed sleep: a case-control study. In: *Journal of sleep research* 22 (6), S. 607–616. DOI: 10.1111/jsr.12075.

**Bijlenga, D.; van der Heijden, K. B.; Breuk, M.; Van Someren, E. J. W.; Lie, M. E. H.; Boonstra, A. M. et al. (2013b):** Associations between sleep characteristics, seasonal depressive symptoms, lifestyle, and ADHD symptoms in adults. In: *Journal of Attention Disorders* 17 (3), S. 261–275. DOI: 10.1177/1087054711428965.

**Bioulac, S.; Chaufton, C.; Taillard, J.; Claret, A.; Sagaspe, P.; Fabrigoule, C. et al. (2015):** Excessive daytime sleepiness in adult patients with ADHD as measured by the Maintenance of Wakefulness Test, an electrophysiologic measure. In: *The Journal of clinical psychiatry* 76 (7), S. 943–948. DOI: 10.4088/JCP.14m09087.

**Boonstra, A. M.; Kooij, J. J. S.; Oosterlaan, J.; Sergeant, J. A.; Buitelaar, J. K.; Van Someren, E. J. W. (2007):** Hyperactive night and day? Actigraphy studies in adult ADHD: a baseline comparison and the effect of methylphenidate. In: *Sleep* 30 (4), S. 433–442. DOI: 10.1093/sleep/30.4.433.

**Brookes, K.; Xu, X.; Chen, W.; Zhou, K.; Neale, B.; Lowe, N. et al. (2006):** The analysis of 51 genes in DSM-IV combined type attention deficit hyperactivity disorder: association signals in DRD4, DAT1 and 16 other genes. In: *Molecular psychiatry* 11 (10), S. 934–953. DOI: 10.1038/sj.mp.4001869.

**Brown, S. A.; Fleury-Olela, F.; Nagoshi, E.; Hauser, C.; Juge, C.; Meier, C. A. et al. (2005):** The period length of fibroblast circadian gene expression varies widely among human individuals. In: *PLoS biology* 3 (10), e338. DOI: 10.1371/journal.pbio.0030338.

**Brown, S. A.; Kunz, D.; Dumas, A.; Westermark, P. O.; Vanselow, K.; Tilmann-Wahnschaffe, A. et al. (2008):** Molecular insights into human daily behavior. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (5), S. 1602–1607. DOI: 10.1073/pnas.0707772105.

**Bunger, M. K.; Wilsbacher, L. D.; Moran, S. M.; Clendenin, C.; Radcliffe, L. A.; Hogenesch, J. B. et al. (2000):** Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. In: *Cell* 103 (7), S. 1009–1017. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)00205-1.

**Caci, H.; Bouchez, J.; Baylé, F. J. (2009):** Inattentive symptoms of ADHD are related to evening orientation. In: *Journal of Attention Disorders* 13 (1), S. 36–41. DOI: 10.1177/1087054708320439.

**Chen, M.-H.; Chen, Y.-S.; Hsu, J.-W.; Huang, K.-L.; Li, C.-T.; Lin, W.-C. et al. (2014):** Comorbidity of ADHD and subsequent bipolar disorder among adolescents and young adults with major depression: a nationwide longitudinal study. In: *Bipolar disorders* 17 (3), S. 315–322. DOI: 10.1111/bdi.12266.

**Chronis-Tuscano, A.; Molina, B. S G; Pelham, W. E.; Applegate, B.; Dahlke, A.; Overmyer, M.; Lahley, B. B. (2010):** Very early predictors of adolescent depression and suicide attempts in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. In: *Archives of general psychiatry* 67 (10), S. 1044–1051. DOI: 10.1001/archgenpsychiatry.2010.127.

**Claustrat, B.; Leston, J. (2015):** Melatonin: Physiological effects in humans. In: *Neuro-Chirurgie* 61 (2-3), S. 77–84. DOI: 10.1016/j.neuchi.2015.03.002.

**Coogan, A. N.; McGowan, N. M. (2017):** A systematic review of circadian function, chronotype and chronotherapy in attention deficit hyperactivity disorder. In: *Attention deficit and hyperactivity disorders* 9 (3), S. 129–147. DOI: 10.1007/s12402-016-0214-5.

**Corkum, P.; Panton, R.; Ironside, S.; Macpherson, M.; Williams, T. (2008):** Acute impact of immediate release methylphenidate administered three times a day on sleep in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. In: *Journal of pediatric psychology* 33 (4), S. 368–379. DOI: 10.1093/jpepsy/jsm106.

**Cornelissen, G. (2014):** Cosinor-based rhythmometry. In: *Theoretical biology & medical modelling* 11, S. 16. DOI: 10.1186/1742-4682-11-16.

**Csoka, A. B.; Szyf, M. (2009):** Epigenetic side-effects of common pharmaceuticals: a potential new field in medicine and pharmacology. In: *Medical hypotheses* 73 (5), S. 770–780. DOI: 10.1016/j.mehy.2008.10.039.

**Czeisler, C. A.; Duffy, J. F.; Shanahan, T. L.; Brown, E. N.; Mitchell, J. F.; Rimmer, D. W. et al. (1999):** Stability, precision, and near-24-hour period of the human circadian pacemaker. In: *Science (New York, N.Y.)* 284 (5423), S. 2177–2181. DOI: 10.1126/science.284.5423.2177.

**Ding, K.; Yang, J.; Reynolds, G. P.; Chen, B.; Shao, J.; Liu, R. et al. (2017):** DAT1 methylation is associated with methylphenidate response on oppositional and hyperactive-impulsive symptoms in children and adolescents with ADHD. In: *The world journal of biological psychiatry: the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry* 18 (4), S. 291–299. DOI: 10.1080/15622975.2016.1224928.

**Duffy, J. F.; Rimmer, D. W.; Czeisler, C. A. (2001):** Association of intrinsic circadian period with morningness-eveningness, usual wake time, and circadian phase. In: *Behavioral neuroscience* 115 (4), S. 895–899. DOI: 10.1037//0735-7044.115.4.895.

**Duffy, J. F.; Czeisler, C. A. (2009):** Effect of Light on Human Circadian Physiology. In: *Sleep medicine clinics* 4 (2), S. 165–177. DOI: 10.1016/j.jsmc.2009.01.004.

**Edel, M.-A.; Vollmoeller, W. (Hrsg.) (2006):** Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörungen bei Erwachsenen. Unter Mitarbeit von Dieter Ebert, Marc-Andreas Edel, Bernd Hessling, Johanna Krause, Klaus-Henning Krause, Alexandra Philipsen et al. Westfälisches Zentrum Bochum, Psychiatrie und Psychotherapie, Klinik der Ruhr-Universität Bochum: Springer Medizin Verlag. DOI: 10.1007/3-540-29993-9.

**Erren, T. C.; Reiter, R. J. (2015):** Melatonin. A universal time messenger. In: *Neuro endocrinology letters* 36 (3), S. 187–192.

**Faraone, S. V.; Biederman, J.; Mick, E. (2006):** The age-dependent decline of attention deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of follow-up studies. In: *Psychological medicine* 36 (2), S. 159–165. DOI: 10.1017/S003329170500471X.

**Faraone, S. V.; Perlis, R. H.; Doyle, A. E.; Smoller, J. W.; Goralnick, J. J.; Holmgren, M. A.; Sklar, P. (2005):** Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. In: *Biological Psychiatry* 57 (11), S. 1313–1323. DOI: 10.1016/j.biopsych.2004.11.024.

**Fargason, R. E.; Hollar, A. F; White, S.; Gamble, K. L. (2013):** Adults with ADHD-without insomnia history have subclinical sleep disturbance but not circadian delay: an ADHD phenotype? In: *Journal of Attention Disorders* 17 (7), S. 583–588. DOI: 10.1177/1087054712458972.

**Foster, R. G.; Kreitzman, L. (2014):** The rhythms of life: what your body clock means to you! In: *Experimental physiology* 99 (4), S. 599–606. DOI: 10.1113/expphysiol.2012.071118.

**Gau, S. S. F.; Kessler, R. C.; Tseng, W.-L.; Wu, Y.-Y.; Chiu, Y.-N.; Yeh, C.-B.; Hwu, H.-G. (2007):** Association between sleep problems and symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder in young adults. In: *Sleep* 30 (2), S. 195–201. DOI: 10.1093/sleep/30.2.195.

**Gonçalves, B. S. B.; Cavalcanti, P. R. A.; Tavares, G. R.; Campos, T. F.; Araujo, J. F. (2014):** Nonparametric methods in actigraphy. An update. In: *Sleep science (Sao Paulo, Brazil)* 7 (3), S. 158–164. DOI: 10.1016/j.slsci.2014.09.013.

**Graaf, R. de; Kessler, R. C.; Fayyad, J.; Have, M. ten; Alonso, J.; Angermeyer, M. et al. (2008):** The prevalence and effects of adult attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) on the performance of workers: results from the WHO World Mental Health Survey Initiative. In: *Occupational and environmental medicine* 65 (12), S. 835–842. DOI: 10.1136/oem.2007.038448.

**Hasan, S.; Santhi, N.; Lazar, A. S.; Slak, A.; Lo, J.; von Schantz, M. et al. (2012):** Assessment of circadian rhythms in humans. Comparison of real-time fibroblast reporter imaging with plasma melatonin. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26 (6), S. 2414–2423. DOI: 10.1096/fj.11-201699.

**Hida, A.; Ohsawa, Y.; Kitamura, S.; Nakazaki, K.; Ayabe, N.; Motomura, Y. et al. (2017):** Evaluation of circadian phenotypes utilizing fibroblasts from patients with circadian rhythm sleep disorders. In: *Translational psychiatry* 7 (4), e1106. DOI: 10.1038/tp.2017.75.

**Hida, A.; Kitamura, S.; Ohsawa, Y.; Enomoto, M.; Katayose, Y.; Motomura, Y. et al. (2013):** In vitro circadian period is associated with circadian/sleep preference. In: *Scientific reports* 3, S. 2074. DOI: 10.1038/srep02074.

**Hiddinga, A. E.; Beersma, D. G.; van den Hoofdakker, R. H. (1997):** Endogenous and exogenous components in the circadian variation of core body temperature in humans. In: *Journal of sleep research* 6 (3), S. 156–163. DOI: 10.3109/07420529709001458.

**Horne, J. A.; Ostberg, O. (1976):** A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. In: *International journal of chronobiology* 4 (2), S. 97–110.

**Horne, J. A.; Ostberg, O. (1977):** Individual differences in human circadian rhythms. In: *Biological psychology* 5 (3), S. 179–190. DOI: 10.1016/0301-0511(77)90001-1.

**Hvolby, A. (2015):** Associations of sleep disturbance with ADHD: implications for treatment. In: *Attention deficit and hyperactivity disorders* 7 (1), S. 1–18. DOI: 10.1007/s12402-014-0151-0.

**Ironside, S.; Davidson, F.; Corkum, P. (2010):** Circadian motor activity affected by stimulant medication in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. In: *Journal of sleep research* 19 (4), S. 546–551. DOI: 10.1111/j.1365-2869.2010.00845.x.

**Karam, R. G.; Breda, V.; Picon, F. A.; Rovaris, D. L.; Victor, M. M.; Salgado, C. A. I. et al. (2015):** Persistence and remission of ADHD during adulthood: a 7-year clinical follow-up study. In: *Psychological medicine* 45 (10), S. 2045–2056. DOI: 10.1017/S0033291714003183.

**Katzenberg, D.; Young, T.; Finn, L.; Lin, L.; King, D. P.; Takahashi, J. S.; Mignot, E. (1998):** A CLOCK polymorphism associated with human diurnal preference. In: *Sleep* 21 (6), S. 569–576. DOI: 10.1093/sleep/21.6.569.

**Kessler, R. C.; Adler, L. A.; Barkley, R.; Biederman, J.; Conners, C. K.; Faraone, S. V. et al. (2005a):** Patterns and predictors of attention-deficit/hyperactivity disorder persistence into adulthood: results from the national comorbidity survey replication. In: *Biological Psychiatry* 57 (11), S. 1442–1451. DOI: 10.1016/j.biopsych.2005.04.001.

**Kessler, R. C.; Adler, L.; Ames, M.; Demler, O.; Faraone, S.; Hiripi, E. et al. (2005b):** The World Health Organization Adult ADHD Self-Report Scale (ASRS). A short screening scale for use in the general population. In: *Psychological medicine* 35 (2), S. 245–256. DOI: 10.1016/j.biopsych.2005.04.001.

**Kissling, C.; Retz, W.; Wiemann, S.; Coogan, A. N.; Clement, R. M.; Hunnerkopf, R. et al. (2008):** A polymorphism at the 3'-untranslated region of the CLOCK gene is associated with adult attention-deficit hyperactivity disorder. In: *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics: the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 147 (3), S. 333–338. DOI: 10.1002/ajmg.b.30602.

**Klerman, E. B.; Dijk, D. J.; Kronauer, R. E.; Czeisler, C. A. (1996):** Simulations of light effects on the human circadian pacemaker. Implications for assessment of intrinsic period. In: *The American journal of physiology* 270 (1 Pt 2), S. 271–282. DOI: 10.1152/ajpregu.1996.270.1.R271.

**Kooij, J. J. S.; Middelkoop, H. A.; van Gils, K.; Buitelaar, J. K. (2001):** The effect of stimulants on nocturnal motor activity and sleep quality in adults with ADHD: an open-label case-control study. In: *The Journal of clinical psychiatry* 62 (12), S. 952–956. DOI: 10.4088/jcp.v62n1206.

**Korf, H. W.; Gall, C. von (2006):** Mice, melatonin and the circadian system. In: *Molecular and cellular endocrinology* 252 (1-2), S. 57–68. DOI: 10.1016/j.mce.2006.03.005.

**Kowalska, E.; Brown, S. A. (2007):** Peripheral clocks. Keeping up with the master clock. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 72, S. 301–305. DOI: 10.1101/sqb.2007.72.014.

**Kushida, C. A.; Chang, A.; Gadkary, C.; Guilleminault, C.; Carrillo, O.; Dement, W. C. (2001):** Comparison of actigraphic, polysomnographic, and subjective assessment of sleep parameters in sleep-disordered patients. In: *Sleep medicine* 2 (5), S. 389–396. DOI: 10.1016/s1349-9457(00)00098-8.

**Lack, L.; Bailey, M.; Lovato, N.; Wright, H. (2009):** Chronotype differences in circadian rhythms of temperature, melatonin, and sleepiness as measured in a modified constant routine protocol. In: *Nature and science of sleep* 1, S. 1–8. DOI: 10.2147/nss.s6234.

**Lack, L. C.; Gradisar, M.; Van Someren, E. J. W.; Wright, H. R.; Lushington, K. (2008):** The relationship between insomnia and body temperatures. In: *Sleep medicine reviews* 12 (4), S. 307–317. DOI: 10.1016/j.smrv.2008.02.003.

**Lasky-Su, J.; Neale, B. M.; Franke, B.; Anney, R. J. L.; Zhou, K.; Maller, J. B. et al. (2008):** Genome-wide association scan of quantitative traits for attention deficit hyperactivity disorder identifies novel associations and confirms candidate gene associations. In: *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics: the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 147B (8), S. 1345–1354. DOI: 10.1002/ajmg.b.30867.

**Lee, S. S.; Humphreys, K. L.; Flory, K.; Liu, R.; Glass, K. (2011a):** Prospective association of childhood attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and substance use and abuse/dependence: a meta-analytic review. In: *Clinical psychology review* 31 (3), S. 328–341. DOI: 10.1007/s00702-010-0510-8.

**Lee, M. J.; Yang, P. B.; Wilcox, V. T.; Bureau, K. D.; Swann, A. C.; Dafny, N. (2011b):** Repetitive methylphenidate administration modulates the diurnal behavioral activity pattern of adult female SD rats. In: *Journal of neural transmission (Vienna, Austria: 1996)* 118 (2), S. 285–298. DOI: 10.1016/j.cpr.2011.01.006.

**Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001):** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4), S. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.

**Lunsford-Avery, J. R.; Kollins, S. H. (2018):** Editorial Perspective. Delayed circadian rhythm phase: a cause of late-onset attention-deficit/hyperactivity disorder among adolescents? In: *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines* 59 (12), S. 1248–1251. DOI: 10.1111/jcpp.12956.

**Mane, V. P.; Heuer, M. A.; Hillyer, P.; Navarro, M. B.; Rabin, R. L. (2008):** Systematic method for determining an ideal housekeeping gene for real-time PCR analysis. In: *Journal of biomolecular techniques: JBT* 19 (5), S. 342–347.

**Mannuzza, S.; Klein, R. G.; Bessler, A.; Malloy, P.; LaPadula, M. (1993):** Adult outcome of hyperactive boys. Educational achievement, occupational rank, and psychiatric status. In: *Archives of general psychiatry* 50 (7), S. 565–576. DOI: 10.1001/archpsyc.1933.01820190067007.

**Marino, M.; Li, Y.; Rueschman, M. N.; Winkelman, J. W.; Ellenbogen, J. M.; Solet, J. M. et al. (2013):** Measuring sleep: accuracy, sensitivity, and specificity of wrist actigraphy compared to polysomnography. In: *Sleep* 36 (11), S. 1747–1755. DOI: 10.5665/sleep.3142

**Marsi, S.; Sassone-Corsi, P. (2010):** Plasticity and specificity of the circadian epigenome. In: *Nature neuroscience* 13 (11), S. 1324–1329. DOI: 10.1038/nn.2668.

**Matthews, M.; Nigg, J. T.; Fair, D. A. (2014):** Attention deficit hyperactivity disorder. In: *Current topics in behavioral neurosciences* 16, S. 235–266. DOI: 10.1007/7854.2013.249.

**McGowan, N. M.; Voinescu, B. I.; Coogan, A. N. (2016):** Sleep quality, Chronotype and social jetlag differentially associate with symptoms of attention deficit hyperactivity disorder in adults. In: *Chronobiology international* 33 (10), S. 1433–1443. DOI: 10.1082/07420528.2016.1208214.

**McIntosh, D.; Kutcher, S.; Binder, C.; Levitt, A.; Fallu, A.; Rosenbluth, M. (2009):** Adult ADHD and comorbid depression: A consensus-derived diagnostic algorithm for ADHD. In: *Neuropsychiatric disease and treatment* 5, S. 137–150. DOI: 10.2147/ndt.s4720.

**Merz, J.; Lehrl, S.; Galster, V.; Erzigkeit, H. (1975):** MWT-B--ein Intelligenzkurztest. In: *Psychiatrie, Neurologie, und medizinische Psychologie* 27 (7), S. 423–428.

**Mohawk, J. A.; Green, C. B.; Takahashi, J. S. (2012):** Central and peripheral circadian clocks in mammals. In: *Annual review of neuroscience* 35, S. 445–462. DOI: 10.1146/annurev-neuro-060909-153128.

**Monk, T. H.; Buysse, D. J.; Billy, B. D.; Fletcher, M. E.; Kennedy, K. S. (2013):** Polysomnographic Sleep and Circadian Temperature Rhythms as a Function of Prior Shift Work Exposure in Retired Seniors. In: *Healthy aging & clinical care in the elderly* 2013 (5), S. 9–19. DOI: 10.4137/HACCE.S11528.

**Morgenthaler, T.; Alessi, C.; Friedman, L.; Owens, J.; Kapur, V.; Boehlecke, B. et al. (2007):** Practice parameters for the use of actigraphy in the assessment of sleep and sleep disorders. An update for 2007. In: *Sleep* 30 (4), S. 519–529. DOI: 10.1093/sleep/30.4.519.

**Müller, A.; Candrian, G.; Kropotov, J. D. (Hrsg.) (2011):** ADHS-Neurodiagnostik in der Praxis. Berlin, Heidelberg: Springer. DOI: 10.1007/978-3-642-20062-5.

**Murray, J. M.; Sletten, T. L.; Magee, M.; Gordon, C.; Lovato, N.; Bartlett, D. J. et al. (2017):** Prevalence of Circadian Misalignment and Its Association With Depressive Symptoms in Delayed Sleep Phase Disorder. In: *Sleep* 40 (1). DOI: 10.1093/sleep/zsw002.

**Nagoshi, E.; Saini, C.; Bauer, C.; Laroche, T.; Naef, F.; Schibler, U. (2004):** Circadian gene expression in individual fibroblasts. Cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. In: *Cell* 119 (5), S. 693–705. DOI: 10.1016/j.cell.2004.11.015.

**Nesbitt, A. D. (2018):** Delayed sleep-wake phase disorder. In: *Journal of thoracic disease* 10 (Suppl 1), S. 103–111. DOI: 10.21037/jtd.2018.01.11.

**O'Keeffe, S. M.; Thome, J.; Coogan, A. N. (2012):** The noradrenaline reuptake inhibitor atomoxetine phase-shifts the circadian clock in mice. In: *Neuroscience* 201, S. 219–230. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.11.002.

**Ono, D.; Honma, S.; Nakajima, Y.; Kuroda, S.; Enoki, R.; Honma, K.-I. (2017):** Dissociation of Per1 and Bmal1 circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus in parallel with behavioral outputs. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (18), S. 3699–3708. DOI: 10.1073/pnas.1613374114.

**Oosterloo, M.; Lammers, G. J.; Overeem, S.; Noord, I. de; Kooij, J J S. (2006):** Possible confusion between primary hypersomnia and adult attention-deficit/hyperactivity disorder. In: *Psychiatry research* 143 (2-3), S. 293–297. DOI: 10.1016/j.psychres.2006.02.009.

**Owens, J. A. (2005):** The ADHD and sleep conundrum: a review. In: *Journal of developmental and behavioral pediatrics: JDBP* 26 (4), S. 312–322. DOI: 10.1097/00004703-200508000-00011.

**Pagani, L.; Semenova, E. A.; Moriggi, E.; Revell, V. L.; Hack, L. M.; Lockley, S. W. et al. (2010):** The physiological period length of the human circadian clock in vivo is directly proportional to period in human fibroblasts. In: *PLoS one* 5 (10), e13376. DOI: 10.1371/journal.pone.0013376.

**Philip, P.; Micoulaud-Franchi, J.-A.; Lagarde, E.; Taillard, J.; Canel, A.; Sagaspe, P.; Bioulac, S. (2015):** Attention Deficit Hyperactivity Disorder Symptoms, Sleepiness and Accidental Risk in 36140 Regularly Registered Highway Drivers. In: *PLoS one* 10 (9), e0138004. DOI: 10.1371/journal.pone.0138004.

**Polanczyk, G.; Lima, M. S. de; Horta, B. L.; Biederman, J.; Rohde, L. A. (2007):** The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. In: *The American journal of psychiatry* 164 (6), S. 942–948. DOI: 10.1176/ajp.2007.164.6.942.

**Reilly, C. J. (2011):** Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in childhood epilepsy. In: *Research in developmental disabilities* 32 (3), S. 883–893. DOI: 10.1016/j.ridd.2011.01.019.

**Retz, W.; Retz-Junginger, P.; Schneider, M.; Scherk, H.; Hengesch, G.; Rösler, M. (2007):** Suchtmittelgebrauch bei jungen erwachsenen Straftätern mit und ohne Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS). In: *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie* 75 (5), S. 285–292. DOI: 10.1055/s-2005-919080.

**Retz, W.; Retz-Junginger, P.; Römer, K.; Rösler, M. (2013):** Standardisierte Skalen zur strukturierten Diagnostik der ADHS im Erwachsenenalter. In: *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie* 81 (7), S. 381–389. DOI: 10.1055/s-0033-1335740.

**Retz-Junginger, P.; Retz, W.; Blocher, D.; Weijers, H. G.; Trott, G. E.; Wender, P. H.; Rössler, M. (2002):** Wender Utah Rating Scale (WURS-k) Die deutsche Kurzform zur retrospektiven Erfassung des hyperkinetischen Syndroms bei Erwachsenen. In: *Der Nervenarzt* 73 (9), S. 830–838. DOI: 10.1007/s00115-001-1215-x.

**Retz-Junginger, P.; Retz, W.; Blocher, D.; Stieglitz, R-D; Georg, T.; Supprian, T. et al. (2003):** Reliabilität und Validität der Wender-Utah-Rating-Scale-Kurzform. Retrospektive Erfassung von Symptomen aus dem Spektrum der Aufmerksamkeitsdefizit/Hyperaktivitätsstörung. In: *Der Nervenarzt* 74 (11), S. 987–993. DOI: 10.1007/s00115-002-1447-4.

**Retz-Junginger, P.; Rösler, M.; Müller, R.; Retz, W. (2012):** Welchen Einfluss hat das Geschlecht auf das Inanspruchnahmeverhalten bei adulter ADHS im Rahmen einer Spezialambulanz? In: *Psychiatrische Praxis* 39 (7), S. 345–348. DOI: 10.1055/s-0032-1305193.

**Roenneberg, T.; Kuehnle, T.; Juda, M.; Kantermann, T.; Allebrandt, K.; Gordijn, M.; Merrow, M. (2007):** Epidemiology of the human circadian clock. In: *Sleep medicine reviews* 11 (6), S. 429–438. DOI: 10.1016/j.smrv.2007.07.005.

**Ruben, M. D.; Smith, D. F.; FitzGerald, G. A.; Hogenesch, J. B. (2019):** Dosing time matters – Circadian precision medicine may supplement genetic precision to improve drug action. In: *Science (New York, N.Y.)* 365(6453), S. 547–549. DOI: 10.1126/science.aax7621.

**Rybak, Y. E.; McNeely, H. E.; Mackenzie, B. E.; Jain, U. R.; Levitan, R. D. (2007):** Seasonality and circadian preference in adult attention-deficit/hyperactivity disorder: clinical

and neuropsychological correlates. In: *Comprehensive psychiatry* 48 (6), S. 562–571. DOI: 10.1016/j.comppsych.2007.05.008.

**Sadeh, A. (2011):** The role and validity of actigraphy in sleep medicine: an update. In: *Sleep medicine reviews* 15 (4), S. 259–267. DOI: 10.1016/j.smrv.2010.10.001.

**Sangal, R. B.; Owens, J.; Allen, A. J.; Sutton, V.; Schuh, K.; Kelsey, D. (2006):** Effects of atomoxetine and methylphenidate on sleep in children with ADHD. In: *Sleep* 29 (12), S. 1573–1585. DOI: 10.1093/sleep/29.12.1573.

**Saylor, K. E.; Amann, B. H. (2016):** Impulsive Aggression as a Comorbidity of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in Children and Adolescents. In: *Journal of child and adolescent psychopharmacology*, 26(1), S. 19–25. DOI: 10.1089/cap.2015.0126.

**Schibler, U.; Sassone-Corsi, P. (2002):** A web of circadian pacemakers. In: *Cell* 111 (7), S. 919–922. DOI:10.1016/s0092-8672(02)01225-4.

**Schlack, R.; Hapke, U.; Maske, U.; Busch, M.; Cohrs, S. (2013):** Häufigkeit und Verteilung von Schlafproblemen und Insomnie in der deutschen Erwachsenenbevölkerung: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). In: *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 56 (5-6), S. 740–748. DOI: 10.1007/s00103-013-1689-2.

**Schredl, M.; Alm, B.; Sobanski, E. (2007):** Sleep quality in adult patients with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). In: *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* 257 (3), S. 164–168. DOI: 10.1007/s00406-006-0703-1.

**Sharp, S. I.; McQuillin, A.; Gurling, H. M. D. (2009):** Genetics of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). In: *Neuropharmacology* 57 (7-8), S. 590–600. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2009.08.011.

**Smalley, S. L.; McGough, J. J.; Moilanen, I. K.; Loo, S. K.; Taanila, A.; Ebeling, H. et al. (2007):** Prevalence and psychiatric comorbidity of attention-deficit/hyperactivity disorder in an adolescent Finnish population. In: *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 46 (12), S. 1575–1583. DOI: 10.1097/chi.0b013e3181573137.

**Sobanski, E.; Schredl, M.; Kettler, N.; Alm, B. (2008):** Sleep in adults with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) before and during treatment with methylphenidate: a controlled polysomnographic study. In: *Sleep* 31 (3), S. 375–381. DOI: 10.1093/sleep/31.3.375.

**Stieglitz, R.-D.; Nyberg, E.; Hofecker-Fallahpour, M. (Hrsg.) (2012):** ADHS im Erwachsenenalter. Göttingen: Hogrefe. DOI: 10.1007/978-3-642-25802-2\_1.

**Stuck, B. A.; Maurer J. T.; Schredl, M.; Weiß, H.-G. (Hrsg.) (2013):** Praxis der Schlafmedizin: Schlafstörungen bei Erwachsenen und Kindern Diagnostik, Differenzialdiagnostik und Therapie. 2. Aufl. Berlin: Springer. DOI: 10.1007/978-3-642-34881-5.

**Surman, C. B; Adamson, J. J.; Petty, C.; Biederman, J. J.; Kenealy, D. C.; Levine, M. et al. (2009):** Association between attention-deficit/hyperactivity disorder and sleep impairment in adulthood: evidence from a large controlled study. In: *The Journal of clinical psychiatry* 70 (11), S. 1523–1529. DOI: 10.1177/1087054705282121.

**Takashima, A. (2001):** Establishment of fibroblast cultures. In: *Current protocols in cell biology* Chapter 2, Unit 2.1. DOI: 10.1002/0471143030.cb0201s00.

**Torgersen, T.; Gjervan, B.; Rasmussen, K. (2006):** ADHD in adults: a study of clinical characteristics, impairment and comorbidity. In: *Nordic journal of psychiatry* 60 (1), S. 38–43. DOI: 10.1080/08039480500520665.

**Turic, D.; Swanson, J.; Sonuga-Barke, E. (2010):** DRD4 and DAT1 in ADHD: Functional neurobiology to pharmacogenetics. In: *Pharmacogenomics and personalized medicine* 3, S. 61–78. DOI: 10.2147/pgpm.s6800.

**Ueda, H. R.; Chen, W.; Adachi, A.; Wakamatsu, H.; Hayashi, S.; Takasugi, T. et al. (2002):** A transcription factor response element for gene expression during circadian night. In: *Nature* 418 (6897), S. 534–539. DOI: 10.1038/nature00906.

**Van Andel, E.; Bijlenga, D.; Vogel, S. W. N.; Beekman, A. T. F.; Kooji, J. J. S. (2021):** Effects of chronotherapy on circadian rhythm and ADHD symptoms in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder and delayed sleep phase syndrome: a randomized clinical trial. In: *Chronobiology international* 38 (2), S. 260–269. DOI: 10.1017/S0033291720001592.

**Van der Heijden, K. B.; Smits, M. G.; Van Someren, E. J W; Gunning, W. B. (2005):** Idiopathic chronic sleep onset insomnia in attention-deficit/hyperactivity disorder: a circadian rhythm sleep disorder. In: *Chronobiology international* 22 (3), S. 559–570. DOI: 10.1081/CBI-200062410.

**Van Dijk, F. E.; Lappenschaar, M.; Kan, C. C.; Verkes, R. J.; Buitelaar, J. K. (2012):** Symptomatic overlap between attention-deficit/hyperactivity disorder and borderline personality disorder in women: the role of temperament and character traits. In: *Comprehensive psychiatry* 53 (1), S. 39–47. DOI: 10.1016/j.comppsych.2011.02.007.

**Van Veen, M. M.; Kooij, J. J. S.; Boonstra, A. M.; Gordijn, M. C. M.; Van Someren, E. J. W. (2010):** Delayed circadian rhythm in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder and chronic sleep-onset insomnia. In: *Biological Psychiatry* 67 (11), S. 1091–1096. DOI: 10.1016/j.biopsych.2009.12.032.

**Voinescu, B. I.; Szentagotai, A.; David, D. (2012):** Sleep disturbance, circadian preference and symptoms of adult attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). In: *Journal of neural transmission (Vienna, Austria: 1996)* 119 (10), S. 1195–1204. DOI: 10.1007/s00702-012-0862-3.

**Wagner, M. L.; Walters, A. S.; Fisher, B. C. (2004):** Symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder in adults with restless legs syndrome. In: *Sleep* 27 (8), S. 1499–1504. DOI: 10.1093/sleep/27.8.1499.

**Ward, M. F.; Wender, P. H.; Reimherr, F. W. (1993):** The Wender Utah Rating Scale: an aid in the retrospective diagnosis of childhood attention deficit hyperactivity disorder. In: *The American journal of psychiatry* 150 (6), S. 885–890. DOI: 10.1176/ajp.150.6.885.

**Welsh, D. K.; Yoo, S.-H.; Liu, A. C.; Takahashi, J. S.; Kay, S. A. (2004):** Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. In: *Current biology: CB* 14 (24), S. 2289–2295. DOI: 10.1016/j.cub.2004.11.057.

**Wender, P. H.; Wolf, L. E.; Wasserstein, J. (2001):** Adults with ADHD. An overview. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 931, S. 1–16. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb05770.x.

**WHO (Hrsg.) (2016): ICD-10-GM Version 2016. F00–F99, Psychische und Verhaltensstörungen.**

**Willcutt, E. G. (2012):** The prevalence of DSM-IV attention-deficit/hyperactivity disorder: a meta-analytic review. In: *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 9 (3), S. 490–499. DOI: 10.1007/s13311-012-0135-8.

**Yamazaki, S.; Numano, R.; Abe, M.; Hida, A.; Takahashi, R.; Ueda, M. et al. (2000):** Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. In: *Science (New York, N.Y.)* 288 (5466), S. 682–685. DOI: 10.1126/science.288.5466.682.

**Ye, R.; Selby, C. P.; Chiou, Y.-Y.; Ozkan-Dagliyan, I.; Gaddameedhi, S.; Sancar; A. (2014):** Dual modes of CLOCK:BMAL1 inhibition mediated by Cryptochrome and Period proteins in the mammalian circadian clock. In: *Genes & development* 28 (18), S. 1989–1998. DOI: 10.1101/gad.249417.114.

**Zhang, R.; Lahrenz, N. F.; Balance, H. I.; Hughes, M. E. Hogenesch, J. B. (2014):** A circadian gene expression atlas in mammals: Implications for biology and medicine. In: *Systems Biology* 111(45), S. 16219–16224. DOI: 10.1073/pnas1408886111.

## 6 Thesen

1. ADHS geht mit einer Vielzahl von Komorbiditäten einher, darunter auch Schlafstörungen.
2. Schlechter Schlaf und Schlafmangel führen zu einer Zunahme von Impulsivität und Aufmerksamkeitsstörungen.
3. Die Mehrzahl der hormonellen und physiologischen Prozesse im Körper unterliegt einer circadianen Rhythmik. Hierbei hat jeder Mensch seinen eigenen, genetisch festgelegten endogenen Biorhythmus, der durch äußere Zeitgeber an einen 24-stündigen Rhythmus synchronisiert wird.
4. Die Fähigkeit, die endogene Rhythmik mit äußeren Einflüssen zu synchronisieren, führt zu interindividuell verschiedenen zeitlichen Präferenzen für die Verteilung von Leistungsphasen sowie Aktivitäts- und Schlafperioden. Je nach Verteilung im Tagesverlauf wird in Chronotypen unterteilt.
5. Für die Generierung der circadianen Rhythmik ist das Zusammenspiel der Clock-Gene verantwortlich, die sich gegenseitig durch ein Netzwerk von positiven und negativen Rückkopplungsschleifen regulieren und so zu einer rhythmischen Aktivierung nachgeschalteter Zielgene führen, die vielfältige Funktionen im Körper haben.
6. Interindividuelle Unterschiede in der circadianen Rhythmik sind auch in peripheren Körperzellen wie den Fibroblasten messbar. Durch verschiedene Methoden lassen sich die Expressionsverläufe der Clock-Gene in kultivierten Fibroblasten bestimmen.
7. Bei ADHS-Patienten liegt überproportional häufig ein Abendtyp vor. Mutationen in Clock-Genen konnten ebenfalls mit dem Vorliegen von ADHS in Verbindung gebracht werden.
8. Bei Einnahme von Methylphenidat und Atomoxetin lassen sich mittels Aktigraphie Veränderungen des Schlafs und der motorischen Aktivität nachweisen, sowohl im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden, als auch im Vergleich zu nicht mit diesen Medikamenten behandelten ADHS-Patienten.
9. Im Vergleich zu den Expressionsverläufen in der Patientengruppe mit Medikation und der Kontrollgruppe, zeigten die mittels PCR gemessenen Expressionsverläufe in der Patientengruppe ohne ADHS-spezifische Medikation direkt nach Synchronisation eine deutlich höhere Expression von *PER2*, sowie eine erniedrigte Expression von *CRY1* acht

Stunden nach Synchronisation und einen zweiten Peak zwölf Stunden nach Synchronisation. In der Patientengruppe mit Medikation und in der Kontrollgruppe trat kein zweiter Peak im Verlauf der *CRY1*-Expression auf.

10. In der Patientengruppe mit Medikation zeigte die Expressionsmessung von *CLOCK* eine signifikant größere Amplitude im Tagesverlauf als in den anderen Versuchsgruppen.

11. Nach Einbringen eines Luciferase-Gens in die Fibroblasten mit Hilfe eines Lentivirus ist durch Lumineszenzmessung eine kontinuierliche Messung des Expressionsverlaufs von *BMAL1*, in dessen Promotor-Region das Gen integriert wurde, möglich. Hinsichtlich des Expressionsmaximums sind hierbei Phasenverschiebungen zwischen den Versuchsgruppen zu verzeichnen.

12. Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass Veränderungen in der Chronobiologie einerseits durch die Erkrankung ADHS selbst verursacht werden können. Andererseits erscheint aber auch eine Beeinflussung der circadianen Rhythmik durch die Einnahme von Medikamenten zur Behandlung der ADHS möglich.

## **7 Anhang**

### **7.1 Abkürzungsverzeichnis**

ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung
ANOVA	Varianzanalyse
ARNT-like	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein
ASRS	Adult ADHD Self-Report Scale
BMAL1	Brain and muscle, ARNT-like protein 1
BMI	Body-Mass-Index
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLOCK	Circadian locomotor output cycles kaput
cm	Zentimeter
CRY	Cryptochrome
DAT1	Dopamintransporter 1-Gen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
D-MEQ	Morningness-eveningness questionnaire, deutsche Version
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRD4	Dopaminrezeptor-D4-Gen
DSM-4	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4. Auflage
DSM-5	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5. Auflage
DSPD	Delayed sleep phase syndrome
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalografie
FBS	Fetales Kälberserum

g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansäure
HWZ	Halbwertszeit
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10. Revision
IDA	Integrierte Diagnose von ADHS im Erwachsenenalter
IQ	Intelligenzquotient
IS	Interdaily stability
IV	Intradaily variability
kg	Kilogramm
l	Liter
L5	5-Stunden Periode mit geringster motorischer Aktivität in Aktigraphie
M10	10-Stunden Periode mit höchster motorischer Aktivität in Aktigraphie
MANCOVA	Multivariate Kovarianzanalyse
Med.	Medikation
MEQ	Morningness-eveningness questionnaire
MESOR	Midline estimating statistic of rhythm
mg	Milligramm
mm	Millimeter

mmol	Millimol
mol	Mol
mRNA	Messenger-Ribonukleisäure
MWT	Mehrfachwahl-Wortschatz-Intelligenztest
ng	Nanogramm
nmol	Nanomol
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PER	Period
PS	Persönlichkeitsstörung
PSG	Polysomnographie
RA	Relative Amplitude
REM-Schlaf	Rapid eye movement-Schlaf
RNA	Ribonukleinsäure
ROR	Retinoic acid receptor-related orphan receptor
RPL13a	Ribosomales Protein L13a
RPL17a	Ribosomales Protein L17a
RZB	Reale Zentrifugalbeschleunigung
SCN	Nucleus suprachiasmaticus
SOI	Sleep onset insomnia
T	Periodendauer
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Enzymeinheit

WASO	Wakening after sleep onset
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WURS-k	Wender Utah Rating Scale, Kurzversion
°C	Grad Celsius
$\mu\text{l}$	Mikroliter
<i>p</i>	Signifikanzwert
$\eta^2$	Partielles Eta-Quadrat
*	$p < 0,05$
**	$p < 0,01$
***	$p < 0,001$

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung der Rückkopplungsschleifen der Clock-Gene (nach Marsi & Sassone-Corsi 2010).....	<b>15</b>
<b>Abbildung 2:</b> Beispielhafter Auszug aus der Software Respirationics Actiware 5.57 eines Probanden. Dargestellt sind die einzelnen Wochentage mit Datum und Uhrzeit. Dunkelblaue Bereiche stellen nicht in die Auswertung eingegangene Zeitabschnitte dar. Hellblau markierte Bereiche kennzeichnen den Schlaf. Gelb dargestellt ist die Belichtungssituation zur jeweiligen Zeit, schwarze Balken entsprechen dem Ausmaß der Aktivität zum jeweiligen Zeitpunkt. Die rote Linie unterhalb der einzelnen Zeilen gibt an, ob Aktivität stattgefunden hat. Entsprechend werden Zeitspannen mit nahezu durchgezogener Linie als Wachphasen und Zeitabschnitte mit nur vereinzelt auftretender Aktivität als Schlaf gewertet.....	<b>28</b>
<b>Abbildung 3:</b> Foto des Berthold TriStar LB 941 im Zellkulturlabor des Center of Brain, Behavior, Metabolism in Lübeck.....	<b>32</b>
<b>Abbildung 4:</b> Kenngrößen bei der Analyse von Cosinor-Funktionen.....	<b>35</b>
<b>Abbildung 5:</b> Prozentuale Verteilung der Chronotypen nach D-MEQ, dargestellt für die einzelnen Versuchsgruppen.....	<b>44</b>
<b>Abbildung 6:</b> Stabilität der Rhythmik über mehrere Tage (Interdaily Stability [IS]) im Gruppenvergleich. Hierbei sind für die IS Werte zwischen 0 und 1 möglich. Je höher die IS, desto stabiler ist die Rhythmik hinsichtlich der Verteilung von Schlaf- und Wachphasen, was für eine gute Synchronisation an äußere Zeitgeber spricht (Med. = ADHS-spezifische Medikation) .....	<b>46</b>
<b>Abbildung 7:</b> Variabilität der Rhythmik innerhalb eines Tages (intradaily variability [IV]) im Gruppenvergleich. Hohe Werte der IV sprechen für eine starke Fragmentierung der Rhythmik, welche durch häufigen Wechsel von Schlaf- und Wachphasen entsteht (Med. = ADHS-spezifische Medikation; * = $p < 0,05$ ).....	<b>46</b>
<b>Abbildung 8:</b> Relative Amplitude (RA) der Aktivität im Tagesverlauf. Hohe RA-Werte sprechen dabei für große Unterschiede der Aktivität im Verlauf eines Tages, insbesondere zwischen Schlaf- und Wachphasen (Med. = ADHS-spezifische Medikation; ** = $p < 0,01$ ; *** = $p < 0,001$ ).....	<b>47</b>

<b>Abbildung 9:</b> Anzahl an Aktivitätszählungen während der fünf inaktivsten Stunden (L5) eines Tages im Gruppenvergleich (Med. = ADHS-spezifische Medikation; * = $p < 0,05$ ; ** = $p < 0,01$ ).....	<b>49</b>
<b>Abbildung 10:</b> Schlafeffizienz in Prozent im Gruppenvergleich. Die Schlafeffizienz bildet dabei den Anteil der im Bett verbrachten Zeit ab, die tatsächlich schlafend verbracht wurde (Med. = ADHS-spezifische Medikation; ** = $p < 0,01$ ; *** = $p < 0,001$ ) .....	<b>49</b>
<b>Abbildung 11:</b> Anzahl der Aktivitätszählungen während der tatsächlich schlafend verbrachten Zeit im Gruppenvergleich (Med. = ADHS-spezifische Medikation).....	<b>50</b>
<b>Abbildung 12:</b> Zeit, die wach verbracht wurde, nach initialem Einsetzen des Nachschlafs in Minuten (Wakening after Sleep Onset [WASO]) im Gruppenvergleich (Med. = ADHS-spezifische Medikation; ** = $p < 0,01$ ; *** = $p < 0,001$ ).....	<b>52</b>
<b>Abbildung 13:</b> Anzahl der nächtlichen Wachphasen im Gruppenvergleich (Med. = ADHS-spezifische Medikation).....	<b>52</b>
<b>Abbildung 14:</b> Durchschnittliche Dauer der einzelnen Wachphasen in der Nacht in Minuten im Gruppenvergleich (Med. = ADHS-spezifische Medikation; ** = $p < 0,01$ ; *** = $p < 0,001$ ).....	<b>53</b>
<b>Abbildung 15:</b> Expressionswerte von <i>CRY1</i> im zeitlichen Verlauf nach Synchronisation, welche zum Zeitpunkt ZT0 erfolgte (** = $p < 0,001$ , h = Stunden).....	<b>55</b>
<b>Abbildung 16:</b> Expressionswerte von <i>PER2</i> im zeitlichen Verlauf nach Synchronisation, welche zum Zeitpunkt ZT0 erfolgte (* = $p < 0,05$ , h = Stunden).....	<b>56</b>
<b>Abbildung 17:</b> Expressionswerte von <i>BMAL1</i> im zeitlichen Verlauf nach Synchronisation, welche zum Zeitpunkt ZT0 erfolgte. h = Stunden.....	<b>57</b>
<b>Abbildung 18:</b> Expressionswerte von <i>PER1</i> im zeitlichen Verlauf nach Synchronisation, welche zum Zeitpunkt ZT0 erfolgte (h = Stunden).....	<b>58</b>
<b>Abbildung 19:</b> Expressionswerte von <i>PER3</i> im zeitlichen Verlauf nach Synchronisation, welche zum Zeitpunkt ZT0 erfolgte (h = Stunden).....	<b>59</b>
<b>Abbildung 20:</b> Expressionswerte von <i>CLOCK</i> im zeitlichen Verlauf nach Synchronisation, welche zum Zeitpunkt ZT0 erfolgte (* = $p < 0,05$ , h = Stunden).....	<b>60</b>

**Abbildung 21:** Schwerpunkte der Kurvenverläufe für *PER1–3*, aufgetragen in Rayleigh-Plots. Abgebildet sind die jeweiligen Gene pro Versuchsgruppe. In jedem Rayleigh-Plot stellt ein Dreieck den Phasenpeak der Rhythmik des Gens eines Probanden dar, zeigt also den Schwerpunkt des Kurvenverlaufs in Abhängigkeit von der Zeit. Der Pfeil entspricht dem Durchschnittswert der jeweiligen Gruppe. Die gebogene Linie außen am Kreis stellt das Konfidenzintervall von 95 % dar. Außen am Kreis ist zudem die Zeit nach Synchronisation aufgetragen, welche ähnlich einer Uhr gelesen werden kann (ZT0 = Zeitpunkt der Synchronisation; ZT6 = 6 Stunden nach Synchronisation; ZT12 = 12 Stunden nach Synchronisation; ZT18 = 18 Stunden nach Synchronisation). Unterschiede in den durchschnittlichen Schwerpunkten sprechen dabei für Phasenverschiebungen der Genexpression im jeweiligen Gen gegenüber den Versuchsgruppen.....62

**Abbildung 22:** Schwerpunkte der Kurvenverläufe für *CRY1*, *BMAL1* und *CLOCK*, aufgetragen in Rayleigh-Plots. In jedem Rayleigh-Plot stellt ein Dreieck den Phasenpeak der Rhythmik des Gens eines Probanden dar, zeigt also den Schwerpunkt des Kurvenverlaufs in Abhängigkeit von der Zeit. Der Pfeil entspricht dem Durchschnittswert der jeweiligen Gruppe. Die gebogene Linie außen am Kreis stellt das Konfidenzintervall von 95 % dar. Außen am Kreis ist zudem die Zeit nach Synchronisation aufgetragen, welche ähnlich einer Uhr gelesen werden kann (ZT0 = Zeitpunkt der Synchronisation; ZT6 = 6 Stunden nach Synchronisation; ZT12 = 12 Stunden nach Synchronisation; ZT18 = 18 Stunden nach Synchronisation). Unterschiede in den durchschnittlichen Schwerpunkten sprechen dabei für Phasenverschiebungen der Genexpression im jeweiligen Gen gegenüber den Versuchsgruppen.....63

**Abbildung 23:** Kontinuierlich gemessene Lumineszenz im zeitlichen Verlauf nach Synchronisation zum Zeitpunkt ZT0 als Ausdruck für die Genexpression des Reporter-Gens *Bmal1::luc* (h = Stunden).....64

**Abbildung 24:** Schwerpunkte der Kurvenverläufe von *Bmal1::luc* je Tag und Gruppe aufgetragen in Rayleigh-Plots. In jedem Rayleigh-Plot stellt ein Dreieck den Phasenpeak der Rhythmik des Gens eines Probanden dar, zeigt also den Schwerpunkt des Kurvenverlaufs in Abhängigkeit von der Zeit. Der Pfeil entspricht dem Durchschnittswert der jeweiligen Gruppe. Die gebogene Linie außen am Kreis stellt das Konfidenzintervall von 95 % dar. Außen am Kreis ist zudem die Zeit nach Synchronisation aufgetragen, welche ähnlich einer Uhr gelesen werden kann (ZT0 = Zeitpunkt der Synchronisation; ZT6 = 6 Stunden nach

Synchronisation; ZT12 = 12 Stunden nach Synchronisation; ZT18 = 18 Stunden nach Synchronisation). Verglichen werden die Schwerpunkte der Gruppen hinsichtlich der gemessenen Lumineszenz als Ausdruck für die Expression von *Bmal1::luc* an den einzelnen Tagen der Aufzeichnung (\* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ )..... **66**

### **7.3 Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1:</b> Verwendete Primer-Sequenzen je Gen.....	<b>31</b>
<b>Tabelle 2:</b> Kenngrößen der aktigraphischen Auswertung.....	<b>38</b>
<b>Tabelle 3:</b> Soziodemografische Kenngrößen nach Gruppen.....	<b>40</b>
<b>Tabelle 4:</b> Während der Studienteilnahme eingenommene Medikation je Gruppe .....	<b>41</b>
<b>Tabelle 5:</b> Psychiatrische Komorbiditäten der Patientengruppen.....	<b>42</b>

## **7.4 Danksagung**

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Thome, der nicht nur das Thema der Arbeit vergeben hat, sondern auch die Möglichkeit geschaffen hat, die Studie in seiner Klinik durchzuführen. Während der gesamten Zeit der Umsetzung der Studie und Anfertigung der Arbeit war er stets ansprechbar und hat mich fachlich und motivierend unterstützt.

Ein Dank gilt auch Frau Uzoni, die durch ihre Arbeit im Labor für Molekulare Psychiatrie maßgeblich am Gelingen der Studie beigetragen hat. Auch Herrn Prof. Dr. Oster möchte ich dafür danken, dass er es ermöglicht hat einen Teil der Experimente in seinem Institut für Neurobiologie in Lübeck durchzuführen. Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Coogan bedanken. Auch Herrn Prof. Dr. Tucha gilt mein ausdrücklicher Dank, da seine Hilfestellung maßgeblich zum Fertigstellen der Dissertation beigetragen hat.

Für die kontinuierliche Motivation, die Dissertation trotz hoher körperlicher und mentaler Belastung im klinischen Alltag der Psychiatrischen Arbeit fertigzustellen möchte ich mich bei meinen Kollegen bedanken, allen voran bei Frau Dr. Mau. Ohne ihre freundliche und herzliche Art wäre ich an manchen Tagen sicher verzweifelt.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern, Geschwistern und Freunden, deren fortwährender Hilfe und Unterstützung ich mir während meiner persönlichen und beruflichen Entwicklung immer sicher sein konnte.

Abschließend möchte ich mich noch bei meinem Ehemann bedanken. Lieber Ragnar, vielen Dank für die stetige Motivation, Unterstützung und Aufheiterung während all der schwierigen und nervenaufreibenden Situationen, die wir in unserer persönlichen und beruflichen Entwicklungen erlebt haben, insbesondere aber bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Ohne Dich und unsere kleine Familie hätte ich diese Herausforderung vielleicht nie gemeistert.

## **7.5 Selbständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, Maria Schenk, an Eides statt, die vorliegende Dissertation mit dem Thema „*Einfluss der Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS) und der ADHS-Medikamente auf den circadianen Rhythmus*“ selbständig und ohne Zuhilfenahme unzulässiger Mittel verfasst zu haben.

Ich habe keine anderen als die von mir angegebene Quellen und Hilfsmittel verwendet und alle inhaltlich oder wörtlich entnommenen Gedanken als solche gekennzeichnet.

Außerdem versichere ich, die beigelegte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht zu haben und in keinem vorausgegangenen Promotionsverfahren endgültig gescheitert zu sein.

Thulendorf, den 21. März 2022

Maria Schenk