

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie  
am Zentrum für Nervenheilkunde der Universität Rostock  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. Johannes Thome

**Einfluss von Fluvoxamin und Triiodthyronin auf die zirkadiane  
Rhythmik im humanen dermalen Fibroblastenmodell**

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

vorgelegt von Luise Weber  
geboren am 10.09.1998 in Lichtenstein

Rostock, 2024

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

Gutachter:innen:

Prof. Dr. med. Dr. phil. Johannes Thome, Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Universitätsmedizin Rostock

Prof. Dr. med. Hans Jürgen Grabe, Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Universitätsmedizin Greifswald

PD Dr. rer. nat. et med. habil. Kirsten Peters, Institut für Zellbiologie, Universitätsmedizin Rostock

Jahr der Einreichung: 2024

Jahr der Verteidigung: 2025

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Der zirkadiane Rhythmus .....	1
1.1.1. Zirkadiane Rhythmik im menschlichen Organismus .....	1
1.1.2. Störung des zirkadianen Rhythmus .....	4
1.2. Serotonin.....	6
1.2.1. Fluvoxamin als selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer .....	6
1.2.2. Interaktion zwischen serotonergem und zirkadianem System .....	8
1.3. Triiodthyronin.....	8
1.3.1. TSH und TSH-Rezeptor .....	9
1.3.2. Physiologische Wirkungen .....	10
1.3.3. T3 und ADHS .....	10
1.4. Fragestellungen.....	11
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>13</b>
2.1. Allgemeine Aspekte .....	13
2.2. Studienteilnehmer:innen.....	13
2.3. Materialien.....	14
2.3.1. Zellkulturmedien und -lösungen.....	14
2.3.2. Medikamente .....	14
2.3.3. Kits .....	14
2.3.4. Primer für qRT-PCR.....	15
2.3.5. Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	15
2.3.6. Software.....	15
2.4. Methoden.....	16
2.4.1. Kultivierung humaner dermaler Fibroblasten.....	16

2.4.2.	Viabilitätstest .....	17
2.4.3.	28-Stunden-Experiment .....	18
2.4.4.	RNA-Isolierung und Quantifizierung .....	19
2.4.5.	Herstellung der cDNA (Reverse Transkription) .....	21
2.4.6.	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) .....	22
2.4.7.	Statistische Auswertung .....	23
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>25</b>
3.1.	Demografische Daten .....	25
3.2.	Viabilität der inkubierten Fibroblasten .....	26
3.3.	Auswirkungen von Fluvoxamin auf die zirkadiane Genexpression .....	28
3.3.1.	Fluvoxamin beeinflusst die zirkadiane Genexpression von <i>Cry1</i> und <i>Per1-3</i> .....	28
3.3.2.	Chronotyp und zirkadiane Genexpression .....	30
3.4.	Auswirkungen von Triiodthyronin auf die zirkadiane Genexpression .....	32
3.4.1.	T3 verändert die zirkadiane Genexpression von ADHS-Patient:innen .....	32
3.4.2.	Auswirkungen von T3 auf die Expression des Thyreotropin-Rezeptors .....	35
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>36</b>
4.1.	Fluvoxamin .....	36
4.1.1.	Einfluss des Chronotypen .....	38
4.2.	Triiodthyronin .....	39
4.3.	Limitierende Studienfaktoren .....	42
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>44</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>45</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>66</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>69</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>70</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>71</b>
	<b>Thesen .....</b>	<b>72</b>

## Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung
Bmal1	Brain and Muscle Arnt-like Protein-1
BMI	Body Mass Index
cDNA	Komplementäre DNA
Clock	Circadian Locomotor Output Cycles Kaput
Cry1	Cryptochrome 1
Ct	Cycle-Threshold
D-MEQ	Morning-Eveningness-Questionnaire (Fragebogen zum Chronotyp)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM-IV	Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen, vierte Auflage
DSPS	Delayed Sleep Phase Syndrome (verzögertes Schlafphasensyndrom)
FBS	Fötales Rinderserum
ft3	Freies Triiodthyronin
HDF	Humane dermale Fibroblasten
ICD-10	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten, zehnte Version
M	Mittelwert
mRNA	Messenger RNA
MWT	Mehrfachwahl-Wortschatz-Intelligenztest
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
Per1-3	Period 1-3
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
SCN	Nucleus suprachiasmaticus
SD	Standardabweichung
SERT	Serotonintransporter
SSRI	Selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
T3	Triiodthyronin

TRH	Thyreotropin-Releasing-Hormon
TSH	Thyreotropin
TSHR	Thyreotropin-Rezeptor
ZP	Zeitpunkt

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Molekulare Organisation der zirkadianen Uhr in Säugetieren (modifiziert nach Young, 2018).....	3
Abbildung 2: Angriffspunkt der SSRI (Hemmung der präsynaptischen Wiederaufnahme von Serotonin durch Blockade des SERT).....	7
Abbildung 3: Regelkreis der Schilddrüsenhormone (Lang & Föller, 2019).....	9
Abbildung 4: Versuchsablauf.....	16
Abbildung 5: Ablauf der RNA-Isolierung (modifiziert nach RNeasy Mini Handbook (Qiagen GmbH, 2019)).....	20
Abbildung 6: Eichgerade zur RNA-Konzentrationsbestimmung.....	20
Abbildung 7: Exemplarische Schmelzkurve der PCR-Analyse von <i>Cry1</i> .....	22
Abbildung 8: Ergebnisse Zellviabilitätstest nach der Inkubation mit Fluvoxamin, n=3.....	27
Abbildung 9: Ergebnisse Zellviabilitätstest nach der Inkubation mit T3, n=4.....	27
Abbildung 10: Relative mRNA-Genexpression der zirkadianen Gene bei Proband:innen ohne neuropsychiatrische Diagnose nach Inkubation mit 0 $\mu$ M und 5 $\mu$ M Fluvoxamin, n=12.....	29
Abbildung 11: Relative mRNA-Genexpression von zirkadianen Genen bei Proband:innen ohne neuropsychiatrische Diagnose nach Inkubation mit 0 $\mu$ M und 5 $\mu$ M Fluvoxamin für neutrale zirkadiane Präferenz (n=7) und Morgenpräferenz (n=5).....	31
Abbildung 12: Relative mRNA-Genexpression von zirkadianen Genen bei Proband:innen mit diagnostizierter ADHS nach Inkubation mit 0 nM und 100 nM T3, n=12. ....	34
Abbildung 13: Relative mRNA-Expression des TSH-Rezeptors bei ADHS-Patient:innen nach Inkubation mit 0 nM und 100 nM T3, n=12.....	35
Abbildung 14: Relative mRNA-Genexpression von zirkadianen Genen bei Proband:innen ohne neuropsychiatrische Diagnose nach Inkubation mit 0 und 100 nM T3, n=12.....	66
Abbildung 15: Relative mRNA-Expression des TSH-Rezeptors bei Proband:innen ohne neuropsychiatrische Diagnose nach Inkubation mit 0 und 100 nM T3, n=12.....	67

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zeitpunkte (ZP) der Probenentnahme .....	19
Tabelle 2: Konzentrationen der im Experiment verwendeten Substanzen .....	19
Tabelle 3: Mix 1 .....	21
Tabelle 4: Mix 2 (cDNA-Synthese-Mix) .....	21
Tabelle 5: Reaktionsbedingungen der qRT-PCR .....	22
Tabelle 6: Demografische Daten der Proband:innen ohne neuropsychiatrische Erkrankung für Fluvoxamin-Studie .....	25
Tabelle 7: Demografische Daten der Proband:innen mit ADHS-Diagnose für T3-Studie .....	26
Tabelle 8: Fluvoxamin Viabilitätstest .....	26
Tabelle 9: T3 Viabilitätstest .....	26
Tabelle 10: Demografische Daten der Proband:innen ohne neuropsychiatrische Diagnose für T3-Studie .....	67
Tabelle 11: Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) für die statistisch signifikanten Zeitpunkte der zirkadianen Genexpression nach Inkubation mit 0 $\mu$ M und 5 $\mu$ M Fluvoxamin .....	67
Tabelle 12: Mittelwerte (M) und Standardabweichungen (SD) für die statistisch signifikanten Zeitpunkte der Genexpression nach Fluvoxamin-Inkubation, aufgeschlüsselt nach Chronotyp .....	68
Tabelle 13: Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) für die statistisch signifikanten Zeitpunkte der zirkadianen Genexpression nach Inkubation mit 0 nM und 100 nM T3 .....	68

# **1. Einleitung**

## **1.1. Der zirkadiane Rhythmus**

Der Begriff „zirkadianer Rhythmus“ stammt aus dem Lateinischen und leitet sich ab von „circa diem“, was „ungefähr ein Tag“ bedeutet (Brainard et al., 2015). Das zirkadiane System fasst physiologische Vorgänge zusammen, welche auf eine Periodenlänge von etwa 24 Stunden synchronisiert sind (Pilorz et al., 2018). Der durch die Erdrotation entstehende Licht-Dunkel-Zyklus bringt regelmäßig wechselnde Umweltbedingungen mit sich. Da eine Anpassung physiologischer Vorgänge und Verhaltensweisen an diesen Rhythmus von evolutionärem Vorteil ist, existieren zirkadiane Rhythmen in einer Vielzahl von Organismen (Sharma, 2003). Die Entstehung eines zirkadianen Rhythmus basiert dabei auf einem komplexen System, der sogenannten inneren Uhr, welche durch exogene Zeitgeber, wie Licht und Nahrungsaufnahme, auf 24 Stunden synchronisiert wird (Berson et al., 2002; Panda, 2016). Bei Abwesenheit der Zeitgeber entsteht ein „freilaufender“ Rhythmus mit einer bestimmten Periodenlänge (Aschoff, 1960). In verschiedenen Spezies finden sich Unterschiede, was den Mechanismus, die Lokalisation des Schrittmachers und auch die Periodenlänge der endogenen Uhr betrifft (Young, 2018).

### **1.1.1. Zirkadiane Rhythmik im menschlichen Organismus**

Viele physiologische Prozesse im menschlichen Organismus unterliegen einer zirkadianen Rhythmik. Studien konnten dies vor allem für den Schlaf-Wach-Rhythmus, die Regulation von Blutdruck, Herzfrequenz und Körpertemperatur feststellen (Davy, 1845; Shea et al., 2011; Zhang et al., 2020). Der zirkadiane Rhythmus des Menschen weist eine Periodenlänge von etwa 24,2 Stunden auf (Czeisler et al., 1999). Ihm liegt ein Uhrwerk zugrunde, welches in einem komplexen Netzwerk organisiert ist (Astiz et al., 2019). Die Koordination dieses Netzwerkes übernimmt dabei der Nucleus suprachiasmaticus (SCN). Dieser fungiert als zentraler Schrittmacher der zirkadianen Uhr (Reppert & Weaver, 2002). Neben ihm existieren „periphere Uhren“, welche zellautonome zirkadiane Rhythmen aufweisen und in jedem bisher untersuchten Gewebe und Organ ausgemacht werden konnten. Die peripheren Gewebe, wie Leber, Muskulatur und Haut, sind in der Lage, eigene zirkadiane Rhythmen zu generieren. Durch die Vernetzung aller Uhren miteinander wird eine Anpassung an den SCN sowie die Abstimmung untereinander sichergestellt (Yamazaki et al., 2000; Yoo et al., 2004).

#### **1.1.1.1. Nucleus suprachiasmaticus**

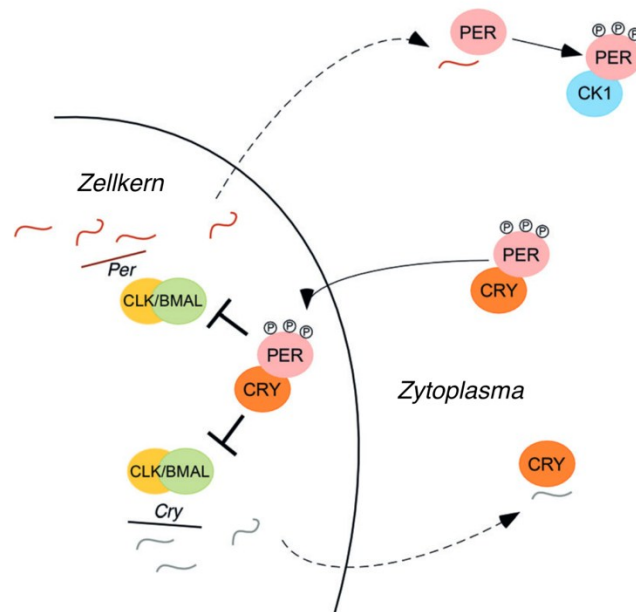
Der SCN befindet sich im vorderen Teil des Hypothalamus und besteht aus etwa 20.000 Neuronen, die einen sich selbsterhaltenden Rhythmus generieren (Ma & Morrison, 2022). In seiner übergeordneten Funktion besitzt der SCN die Fähigkeit, auf die exogenen Zeitgeber aus der Umwelt zu reagieren und seinen Rhythmus mit den peripheren Geweben abzustimmen (Astiz et al., 2019). Licht hat hierbei den größten Einfluss als exogener Zeitgeber (Reppert & Weaver, 2002). Für die Synchronisation des endogenen Rhythmus mit den vorherrschenden Lichtverhältnissen erhält der SCN Informationen aus photosensitiven retinalen Ganglienzellen (Moore & Lenn, 1972). Über den Tractus retinohypothalamicus werden diese Informationen unter anderem an die Epiphyse weitergeleitet. Hier wird die Melatoninsynthese und -freisetzung reguliert. Da Melatonin wiederum die Rhythmogenese im SCN beeinflusst, entsteht ein Regelkreis, welcher als photoneuroendokrines System bezeichnet wird (Weaver, 1999). Der SCN wird auf den Tag-Nacht-Rhythmus abgestimmt und somit die endogene zirkadiane Periodenlänge auf 24 Stunden zurückgesetzt (Lubkin et al., 2002).

#### **1.1.1.2. Die molekulare Uhr**

Die Grundlage der zirkadianen Rhythmusgenerierung bilden sogenannte „Uhrengene“. Diese zirkadianen Gene wurden bislang in allen untersuchten Geweben gefunden (Yoo et al., 2004). In den letzten Jahrzehnten konnten einzelne Gene sequenziert und somit der molekulare Mechanismus zunehmend verstanden werden. Der Prozess läuft in autoregulatorischen Zyklen ab. Ein Zyklus besteht aus einem positiven, transkriptionsfördernden Teil und einem negativen, transkriptionshemmenden Teil, welche gemeinsam eine Rückkopplungsschleife bilden (Takahashi et al., 2008).

Die beiden Uhrengenproteine CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput) und BMAL1 (Brain and Muscle Arnt-like Protein-1) sind dabei positive Bestandteile der Rückkopplungsschleife. Sie sorgen nach ihrer Heterodimerisierung und Translokation in den Zellkern durch Bindung an die E-Box-Promotorelemente für die Expression von *Per* (*Period*) und *Cry* (*Cryptochrome*). Die Genprodukte PER und CRY werden anschließend im Zytoplasma an den Ribosomen gebildet. Infolge einer Phosphorylierung der PER-Proteine durch die Caseinkinase 1, kommt es zur Komplexbildung von PER und CRY und deren Translokation in den Zellkern. Dieser Komplex agiert als negativer Bestandteil der Rückkopplungsschleife, indem er die transkriptionsfördernde Aktivität des CLOCK/BMAL1-Komplexes unterdrückt und somit auch die Expression von *Per* und *Cry*. Damit endet ein Zyklus nach etwa 24 Stunden.

Eine weitere Phosphorylierung des PER/CRY-Komplexes führt anschließend zu dessen proteasomalem Abbau. Durch die aufgehobene Blockade von CLOCK und BMAL1 kann ein neuer Zyklus beginnen (Reppert & Weaver, 2001; Buhr & Takahashi, 2013).



**Abbildung 1: Molekulare Organisation der zirkadianen Uhr in Säugetieren (modifiziert nach Young, 2018)**

### 1.1.1.3. Chronotypen

Menschen unterliegen einem zirkadianen Rhythmus. Trotzdem finden sich interindividuelle Unterschiede hinsichtlich unserer Schlaf- und Aktivitätszeiten. Je nachdem wie sich diese relativ zum Tag-Nacht-Rhythmus ausprägen, unterscheidet man 3 (oder 5) Chronotypen. Den Morgentyp (definitiven und moderaten Morgentyp), den Abendtyp (definitiven und moderaten Abendtyp) sowie den Neutraltyp. Wie die Bezeichnungen es vermuten lassen, weisen Morgentypen eine starke Präferenz für die erste Tageshälfte auf, während Abendtypen ihre höchste Leistungsfähigkeit am Spätnachmittag und Abend erreichen. Daraus resultiert die Neigung zum frühen Aufstehen bei Morgentypen sowie das späte Zubettgehen bei Abendtypen. Der Großteil der Menschen befindet sich als Neutraltyp zwischen diesen beiden Extremen (Horne & Ostberg, 1976; Müller & Haag, 2018; Taillard et al., 2021). Der individuelle Chronotyp ist zu einem großen Teil genetisch bedingt, wird jedoch beeinflusst durch Alter, Geschlecht und Umweltfaktoren (Roenneberg et al., 2007).

Zwischen den Chronotypen existieren Unterschiede in Bezug auf die zirkadianen Rhythmen einiger physiologischer Parameter, wie beispielsweise der Körpertemperatur und der Melatoninsekretion. Für diese beiden Parameter lässt sich ein „Phasenvorlauf“ der

Morgentypen von 2-3 Stunden im Vergleich zu den Abendtypen feststellen (Lack, 2009). Neben dieser Phasenverschiebung finden sich auch Unterschiede hinsichtlich der endogenen zirkadianen Periodenlänge. Während Morgentypen eine verkürzte endogene Periodenlänge von 24,1 Stunden aufweisen, zeigen Abendtypen eine verlängerte Periodendauer von etwa 24,3 Stunden (Lack, 2009).

### **1.1.2. Störung des zirkadianen Rhythmus**

Eine Störung des zirkadianen Rhythmus entsteht durch eine Desynchronisation zwischen der inneren Uhr und dem exogenen Tag-Nacht-Rhythmus. Angesichts der zahlreichen physiologischen Vorgänge und Verhaltensweisen, die an den zirkadianen Rhythmus gekoppelt sind, ist es naheliegend, dass eine solche Veränderung zu körperlichen und psychischen Symptomen oder gar Erkrankungen führt. Die genauen Auswirkungen sind dabei von wissenschaftlichem Interesse. In den letzten Jahren konnte ein positiver Zusammenhang zwischen der Dysregulation des zirkadianen Rhythmus durch Schichtarbeit und dem Auftreten sowie Fortschreiten von Krebserkrankungen festgestellt werden (Davis et al., 2001; Fu & Lee, 2003). Auch lassen sich Belege für ein erhöhtes Risiko in Bezug auf die Entwicklung eines metabolischen Syndroms finden (Turek et al., 2005; Cheng et al., 2021). Der Anteil einer zirkadianen Rhythmusstörung an der Entstehung und dem Fortschreiten von Morbus Alzheimer wird diskutiert (Uddin et al., 2020; Li et al., 2021). Ein Zusammenhang zwischen zirkadianem Rhythmus und affektiven Störungen wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht. Ein gestörter Schlaf-Wach-Rhythmus konnte dabei als Risikofaktor für Depressionen ausgemacht werden (Ford & Kamerow, 1989). Studien fanden in depressiven Patient:innen eine zirkadiane Phasenverschiebung, welche sich unter anderem anhand der Körpertemperatur und des Cortisolspiegels feststellen ließ (Linkowski et al., 1985; Souetre et al., 1988). Der „seasonal affective disorder“ (SAD), einer Form der Depression, liegt dabei eine Fehlregulierung der zirkadianen Uhr aufgrund verringerter Tageslichtstunden zugrunde (Monteleone & Maj, 2008). Die SAD konnte mit Variationen (Single Nucleotide Polymorphism) der Gene *Bmall* und *Per2* in Verbindung gebracht werden (Partonen et al., 2007). Eine Assoziation zwischen Genvarianten von *Cry1*, *Cry2* und *Per2* mit der Anfälligkeit für Depressionen wurde beobachtet (Lavebratt, Sjöholm, Soronen, et al., 2010; Soria et al., 2010; Lavebratt, Sjöholm, Partonen, et al., 2010). Bei der bipolaren Störung konnte ein Zusammenhang mit spezifischen Sequenzvarianten des Uhrengens *Clock* festgestellt werden (Soria et al., 2010).

### 1.1.2.1. Zirkadiane Rhythmik bei ADHS-Patient:innen

Ein weiteres Krankheitsbild, welches mit zirkadianen Rhythmusstörungen assoziiert ist, ist die Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung (ADHS). ADHS zählt zu den häufigsten psychiatrischen Störungen und ist gekennzeichnet durch die Kardinalsymptome Unaufmerksamkeit, Impulsivität und Hyperaktivität (Kooij et al., 2019). Darüber hinaus äußert sich ADHS durch Beeinträchtigung der alltäglichen Funktionsfähigkeit wie Desorganisation, Affektlabilität und hohe Stressintoleranz (Schmidt et al., 2012). ADHS ist zwar eine in der Kindheit auftretende neurologische Entwicklungsstörung, doch ist sie, aufgrund der recht hohen Persistenzrate von 65%, auch im Erwachsenenalter eine häufig auftretende und einschränkende Erkrankung (Faraone et al., 2006). Die Prävalenz der adulten ADHS wird auf 2,8% geschätzt (Fayyad et al., 2017).

Studien weisen darauf hin, dass über die Hälfte der erwachsenen ADHS-Patient:innen unter Schlafstörungen leiden (Yoon et al., 2012). Es zeigen sich vermehrt Schwierigkeiten beim Einschlafen, häufiges nächtliches Erwachen und somit auch eine kürzere durchschnittliche Schlafdauer (Boonstra et al., 2007; Sobanski et al., 2008; Konofal et al., 2010). Darüber hinaus lässt sich eine übermäßige Tagesschläfrigkeit bei Patient:innen mit diagnostizierter ADHS beobachten (Golan et al., 2004). Die mit ADHS assoziierten Schlafstörungen sind auch deshalb so interessant, da die Kardinalsymptome der Erkrankung auch bei gesunden Erwachsenen durch Schlafentzug hervorgerufen werden und somit eine kausale Rolle spielen könnten (Corkum et al., 1998).

In mehreren Studien konnte eine Abweichung des Chronotyps im Vergleich zu Personen ohne neuropsychiatrische Erkrankung festgestellt werden. Sowohl unter Kindern als auch unter Erwachsenen mit ADHS ist die Prävalenz des Abendtyps deutlich erhöht (Rybak et al., 2007; Bijlenga et al., 2013; Bioulac et al., 2021). Die Ausprägung des Abendtyps bei ADHS-Patient:innen ist wiederum mit einem höheren Schweregrad der Symptomatik assoziiert (Coogan & McGowan, 2017). Neben der Veränderung des Chronotyps finden sich auch Auffälligkeiten hinsichtlich der zirkadianen Gene. Baird et al. (2012) konnten einen Verlust der rhythmischen Expression von *Per2* und *Bmal1* in Zellen der Mundschleimhaut von ADHS-Patient:innen feststellen. Die Ergebnisse von Dück et al. (2022) lassen vermuten, dass diese Veränderung ein stabiler Marker für ADHS sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen ist. Die Ergebnisse von Coogan et al. (2019) ergaben zudem Veränderungen in der Expression von *Cry1* bei ADHS-Patient:innen.

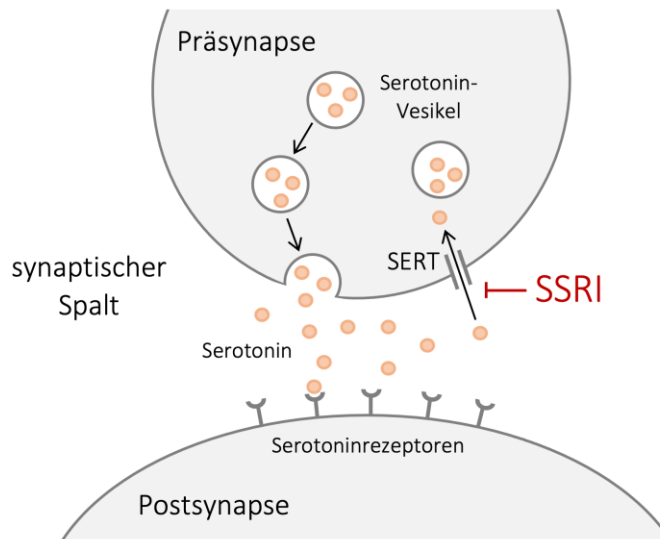
Es finden sich Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen einer Veränderung der zirkadianen Rhythmik auf molekularer Ebene und der Pathophysiologie von ADHS. Dabei stellten Kissling et al. (2008) die Assoziation der Erkrankung mit einem *Clock*-Genpolymorphismus (*Clock* 3111 T/C rs1801260) fest. Dieser Zusammenhang konnte bislang durch eine Studie mit Kindern aus Taiwan sowie einer weiteren Studie mit einer Stichprobe mexikanischer Jugendlicher bestätigt werden (Xu et al., 2010; Cabrera Lagunes et al., 2022). Auch ein *Per1*-Genpolymorphismus (*Per1* rs2518023) konnte mit der Anfälligkeit für ADHS in Verbindung gebracht werden (Wang et al., 2020).

## **1.2. Serotonin**

Serotonin, auch als 5-Hydroxytryptamin (5-HT) bezeichnet, ist ein wichtiger Transmitter, welcher an einer Vielzahl physiologischer Prozesse im menschlichen Körper beteiligt ist. Als Neurotransmitter im Zentralnervensystem ist es unter anderem an der Regulation der Stimmung, des Hungergefühls, der Körpertemperatur und der Schmerzwahrnehmung beteiligt. Darüber hinaus übt es Einfluss auf den Schlaf-Wach-Rhythmus und das zirkadiane System aus (Lucki, 1998). Die Biosynthese von Serotonin erfolgt über Hydroxylierung und Decarboxylierung aus Tryptophan (Kriegebaum et al., 2010). Seine Wirkung wird über prä- und postsynaptische Serotoninrezeptoren vermittelt, welche in 7 Familien (5-HT<sub>1</sub> bis 5-HT<sub>7</sub>) unterschieden werden (Nichols & Nichols, 2008). Für die Wiederaufnahme des Serotonins aus dem synaptischen Spalt in die Zelle sorgt der Serotonin-Transporter (SERT), welcher damit eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion einnimmt. Die serotonergen Neurone befinden sich in den Raphe-Kernen, von denen sich Projektionen in alle Teile des Zentralnervensystems erstrecken (Trepel, 2022). Eine Dysfunktion des serotonergen Systems ist assoziiert mit psychiatrischen Erkrankungen wie Depressionen, Angststörungen und Schizophrenie (Lesch & Mössner, 1998; Ressler & Nemeroff, 2000).

### **1.2.1. Fluvoxamin als selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer**

Eine wichtige Medikamentengruppe, welche das serotonerge System als Angriffspunkt nutzt, ist die Gruppe der selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI). Sie verhindern die Wiederaufnahme von Serotonin in die präsynaptische Zelle, indem sie eine selektive Hemmung des SERT bewirken (siehe Abbildung 2). SSRI sorgen somit für eine Erhöhung von Serotonin im synaptischen Spalt und fördern die serotonerge Neurotransmission (Haney et al., 2013). Dies ermöglicht die Pharmakotherapie einiger psychiatrischer Erkrankungen wie Depressionen, Angst- und Zwangserkrankungen (Neuraxpharm®, 2013; Ratiopharm®, 2019).



**Abbildung 2: Angriffspunkt der SSRI (Hemmung der präsynaptischen Wiederaufnahme von Serotonin durch Blockade des SERT)**

Ein Vertreter der SSRI ist Fluvoxamin. Studien zur Bindung von Fluvoxamin an Rezeptoren zeigten eine vernachlässigbare Bindung adrenerger, histaminerger, cholinerg, dopaminerger und serotonerger Rezeptoren. Die Plasmahalbwertszeit bei einer kontinuierlichen Verabreichung beträgt 17 - 22 Stunden (bei der Einmalgabe 13 - 15 Stunden). Fluvoxamin wird fast vollständig in der Leber biotransformiert, wobei die zwei Hauptmetaboliten keine nennenswerte pharmakologische Aktivität aufweisen. Fluvoxamin ist ein starker Inhibitor von CYP1A2, hemmt in schwächerem Ausmaß auch CYP2C und CYP3A4 und in sehr geringem Ausmaß CYP2D6. Die Ausscheidung der inaktiven Metabolite erfolgt über die Niere (Neuraxpharm®, 2013). In klinischen Studien konnte die Wirksamkeit von Fluvoxamin zur Therapie von depressiven Erkrankungen und Zwangsstörungen nachgewiesen werden (Lapierre et al., 1987; Perse et al., 1987; Ottevanger, 1994).

Im Rahmen der SARS-CoV-2-Pandemie wurde Fluvoxamin als mögliche Therapieoption diskutiert. Dabei berief man sich unter anderem auf die antientzündliche Wirkung von Fluvoxamin, welche über einen Agonismus am Sigma-1-Rezeptor vermittelt wird (Rosen et al., 2019). Im Rahmen der STOP COVID- und der TOGETHER-Studie wurden Erfolge sichtbar (Lenze et al., 2020; Reis et al., 2022). Die Therapie ambulanter Hochrisikopatient:innen mit Fluvoxamin führte zu einer reduzierten Hospitalisierungsrate (Reis et al., 2022). Darauf folgende Studien (STOP COVID 2, COVID-OUT) konnten die Wirksamkeit nicht bestätigen. Ein Zulassungsantrag für Fluvoxamin zur Behandlung von Covid-19 wurde bisher abgelehnt (Wörmann, 2022).

### **1.2.2. Interaktion zwischen serotonergem und zirkadianem System**

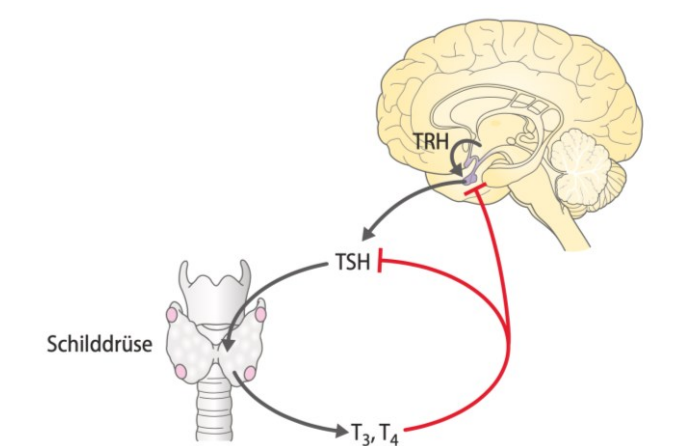
Serotonin war einer der ersten Neurotransmitter, für den eine Verbindung zum Schlaf-Wach-Rhythmus gezeigt werden konnte (Bradley & Hance, 1956). Serotonin wird dabei sowohl als Wach-, als auch als Schlafneurotransmitter beschrieben (Portas et al., 2000). Bei Ratten konnte beobachtet werden, dass ein akuter Mangel an Serotonin zu einer Störung des Schlaf-Wach-Rhythmus und der Aktivität führt. Serotonin sorgte dabei für eine Erhöhung der Kontinuität der Schlaf- und der Wachperiode (Nakamaru-Ogiso et al., 2012).

Das serotonerge und das zirkadiane System sind eng miteinander verbunden. Moore & Speh (2004) konnten zeigen, dass die, von den Raphe-Kernen ausgehenden, serotonergen Bahnen die Aktivität des SCN beeinflussen. Wichtige Signalmoleküle des serotonergen Systems, wie beispielsweise der SERT, werden im SCN exprimiert (Borgers et al., 2014). Serotonin ist in der Lage, die Weiterleitung der, aus der Retina kommenden, Informationen an den SCN zu unterdrücken (Pickard et al., 1999; Smith et al., 2001). Auch der Einfluss auf nicht-photische Reize konnte gezeigt werden (Glass et al., 2003). Serotonin übt somit eine modulierende Wirkung auf das zirkadiane System aus. Diese Wirkung konnte durch Studien mit SSRI untermauert werden. So führte beispielweise die Verabreichung von Fluoxetin, einem SSRI, in Neuronen des SCN zu einer Phasenverschiebung (Sprouse et al., 2006). Neben dem Effekt von Serotonin auf das zirkadiane System, existiert auch ein umgekehrter Einfluss. Gene der molekularen Uhr werden in den Raphe-Kernen exprimiert und die Aktivität wichtiger Komponenten des serotonergen Systems unterliegen einem zirkadianen Rhythmus (Malek et al., 2007).

### **1.3. Triiodthyronin**

Die Hormone Triiodthyronin (T3) und Thyroxin (T4) werden in den Follikelzellen der Schilddrüse, den Thyreozyten, synthetisiert. Die Steuerung ihrer Synthese, aber auch ihrer Sekretion, erfolgt über das hypothalamische Thyreotropin-freisetzende Hormon (TRH) und das hypophysäre schilddrüsenstimulierende Hormon Thyreotropin (TSH). Ein Gleichgewicht der Hormone wird über den thyreotropen Regelkreis gewährleistet. Dabei hemmen die Schilddrüsenhormone T3 und T4 die Freisetzung von TRH und TSH im Sinne einer negativen Rückkopplung (van de Loo & Harbeck, 2020). Über das Blut gelangen die Schilddrüsenhormone zu den entsprechenden Organen. Im Zytosol der Zielzellen erfolgt die Umwandlung von T4 zu T3, welches eine kürzere Halbwertszeit und eine höhere biologische Aktivität aufweist (Lerman, 1954; van de Loo & Harbeck, 2020). Die Wirkung wird

anschließend über die Bindung an, im Zellkern lokalisierte, Schilddrüsenhormonrezeptoren vermittelt. Die Hormone bewirken dabei eine Förderung der Transkription und somit der Synthese bestimmter Proteine (Klinke et al., 2010).



**Abbildung 3: Regelkreis der Schilddrüsenhormone (Lang & Föllner, 2019)**

### 1.3.1. TSH und TSH-Rezeptor

TSH spielt eine entscheidende Rolle in Bezug auf Funktion und Wachstum der Schilddrüse. Seine Wirkung wird über den G-Protein-gekoppelten TSH-Rezeptor vermittelt, welcher auf der Oberfläche von Thyreozyten exprimiert wird (Kleinau & Krause, 2009; Klinke et al., 2010). Studien der letzten Jahre zeigten, dass sich der TSH-Rezeptor in einer Vielzahl von Geweben finden lässt, unter anderem in Hypophyse und Hypothalamus, den Eierstöcken und Hoden, dem Knochenmark und der Haut (Cianfarani et al., 2010; Williams, 2011). Welche Funktion der Rezeptor in diesen Geweben ausübt, wird noch untersucht. Die TSH-Sekretion weist einen zirkadianen Rhythmus auf. Es wurde eine neuronale Verbindung vom SCN zum Nucleus paraventricularis gefunden, welche die anatomische Grundlage für die zirkadianen Schwankungen von TRH, und infolgedessen von TSH, darstellen könnte (Kalsbeek & Fliers, 2013). Es zeigt sich für TSH ein Sekretionsmaximum in den frühen Morgenstunden (Van Cauter et al., 1974; Philippe & Dibner, 2015). T<sub>3</sub> weist ein solches Maximum mit einer Phasenverzögerung von 1,5 Stunden im Vergleich zu TSH auf (Dibner et al., 2017). Auch im Modellorganismus Ratte konnten zirkadiane Schwankungen von T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub> festgestellt werden. Eine Hypophysektomie führte dabei zu einer Aufhebung dieser Rhythmik und einer generellen Senkung der Schilddrüsenhormone. Dies legt nahe, dass die Sekretion der Schilddrüsenhormone abhängig ist vom SCN und dessen Auswirkungen auf den TSH-Spiegel (Fahrenkrug et al., 2017).

### 1.3.2. Physiologische Wirkungen

Die Schilddrüsenhormone sind essenziell für die körperliche und geistige Entwicklung und wirken sich auf den gesamten Gewebestoffwechsel aus. Dabei regulieren sie den Energieverbrauch über die Beeinflussung von Protein-, Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel. Sie stimulieren die Proteinsynthese, steigern Glukoseresorption und Glykolyse sowie Lipolyse. Als Folge ihrer Stoffwechselwirkungen sorgen die Schilddrüsenhormone für eine Zunahme des Grundumsatzes und der Thermogenese. Darüber hinaus üben sie einen Einfluss auf Herz, Niere, Haut, Darm, Muskel und Nervensystem aus (Lang & Föller, 2019).

T3 hat zudem Auswirkungen auf den zirkadianen Rhythmus. Die Expression zentraler zirkadianer Gene wird durch den Schilddrüsenhormonspiegel beeinflusst. An hypothyreoten Ratten konnte eine Aufhebung des zirkadianen Expressionsmusters von *Bmal1* und *Per2* in der Hypophyse und von *Per2* in den Kardiomyozyten gezeigt werden (Peliciari-Garcia et al., 2018; Bargi-Souza et al., 2019). Auch die Thyreoidektomie führte bei Ratten zu einem signifikant veränderten Tagesmuster der *Per2*-Expression in der Stria terminalis und der Amygdala (Amir & Robinson, 2006). Eine Hyperthyreose sorgte bei Ratten für eine erhöhte Expression von *Bmal1* in der Hypophyse (Bargi-Souza et al., 2019). In den Kardiomyozyten von Ratten wiederum führte eine Hyperthyreose zu einer verringerten Amplitude von *Bmal1* (Peliciari-Garcia et al., 2018).

### 1.3.3. T3 und ADHS

Schilddrüsenhormone wirken sich auf die Gehirnfunktion aus. Aus Störungen der Hormonlevel können somit Störungen der motorischen, affektiven und kognitiven Funktionen resultieren (Chambers et al., 2021). Bereits gering ausgeprägte Formen einer Hypothyreose verursachen Symptome wie Nervosität, Müdigkeit und Hyperaktivität (Ahmed et al., 2008). Somit kann sich die Schilddrüsenhormonstörung durch eine ähnliche Symptomatik äußern wie die ADHS. Studien ergaben, dass eine mütterliche Hypothyreose das Risiko einer ADHS-Erkrankung beim Kind erhöht (Peltier et al., 2021). Doch nicht nur ein Mangel an Schilddrüsenhormonen ist mit dem Krankheitsbild assoziiert, sondern auch die hyperthyreote Stoffwechsellage. Laut einer Studie von 2019 beträgt das Verhältnis der Prävalenz von ADHS bei Kindern mit einer Hyperthyreose 1,7 im Vergleich zu Kindern ohne Hyperthyreose (Zader et al., 2019). Albrecht et al. (2020) stellten einen Zusammenhang zwischen dem fT3- und TSH-Spiegel und dem Auftreten von ADHS-Symptomen bei Kindern fest. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass ein erhöhter fT3-Spiegel sowie ein niedriger TSH-Spiegel mit einem höheren Risiko für ADHS

verbunden sind. Es zeigte sich zudem eine Assoziation von ADHS mit einer peripheren Schilddrüsenresistenz (Hauser et al., 1993). Aufgrund dessen, dass im Rahmen einiger Studien eine gehäufte Prävalenz von Schilddrüsenanomalien bei ADHS-Patient:innen im Vergleich zu Personen ohne neuropsychiatrische Diagnose festgestellt werden konnte, empfiehlt Millichap (2008) eine routinemäßige Untersuchung der T3- und TSH-Spiegel bei Kindern mit einer ADHS-Diagnose.

#### **1.4. Fragestellungen**

Der Schlaf spielt eine fundamentale Rolle in Bezug auf die körperliche und geistige Gesundheit. Anhaltende Schlafbeschwerden bedeuten für den Organismus Stress und stellen somit eine enorme Belastung dar (Dijk & Landolt, 2019). Etwa ein Drittel der erwachsenen Bevölkerung leidet unter Schlafstörungen (Fietze & Penzel, 2019). Der Erforschung des Schlafes und der Ursachen für Schlafstörungen kommt somit ein hoher Stellenwert zu. Die Störung des zirkadianen Rhythmus als mögliche Ursache war und ist Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten.

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Substanzen die zirkadiane Genexpression in humanen dermalen Fibroblasten (HDF) beeinflussen (Palm et al., 2021; Faltraco et al., 2021; Faltraco et al., 2021). Auch in dieser Forschungsarbeit wurde die Auswirkung von Substanzen auf den zirkadianen Rhythmus *in vitro* mittels HDF-Kulturen untersucht. Die Kulturen entstanden aus Hautbiopsien, welche von Proband:innen ohne neuropsychiatrische Erkrankung und Proband:innen mit einer ADHS-Diagnose gewonnen wurden. Die HDF-Kultur stellt ein geeignetes Modell zur Untersuchung der zirkadianen Genexpression dar, da individuelle Spendereigenschaften bestehen bleiben und in der Genexpression abgebildet werden können (Coogan et al., 2019). Kultivierte Fibroblasten besitzen eine molekulare Ähnlichkeit zu den Zellen des zentralen Nervensystems, können sich über mehr als 20 Passagen ohne genetische Manipulation vermehren und weisen einen zellautonomen selbsterhaltenden zirkadianen Rhythmus auf (Nagoshi et al., 2004; Kálmán et al., 2016). Sie eignen sich für *in-vitro*-Studien zur Wirkung pharmakologischer Substanzen (Hida et al., 2013; Kálmán et al., 2016).

Schlafprobleme, Tagesschläfrigkeit und vermehrte Müdigkeit als Folge der Einnahme von Psychopharmaka sind häufige Phänomene (Gahr et al., 2018). Diese Auswirkungen werden oftmals als Folge von Schlaflosigkeit angesehen. Hermesh et al. (2001) beschreiben jedoch 10

Fälle, bei denen Fluvoxamin eine Störung des zirkadianen Rhythmus hervorruft. Bei den Patient:innen zeigte sich eine Verzögerung der Schlafphasen. Auch Studien an Mäusen und Ratten zeigten Hinweise auf eine Beeinflussung der zirkadianen Genexpression durch Fluvoxamin (Nomura et al., 2008; Rozenblit-Susan et al., 2016).

In mehreren tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass Schilddrüsenhormone die zirkadiane Genexpression beeinflussen (Amir & Robinson, 2006; Peliciari-Garcia et al., 2018; Bargi-Souza et al., 2019). Sowohl T3 als auch der TSH-Rezeptor zeigen eine Assoziation mit der Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung, einer Erkrankung, welche wiederum mit dem Auftreten von zirkadianen Rhythmusstörungen in Verbindung gebracht wird (Hvolby, 2015; Albrecht et al., 2020).

Aus den Überlegungen leiten sich folgende Fragestellungen ab:

- Welchen Einfluss übt Fluvoxamin im humanen dermalen Fibroblastenmodell auf die Expression der zirkadianen Gene von Proband:innen ohne neuropsychiatrische Diagnose aus?
- Welchen Einfluss übt Triiodthyronin (T3) im humanen dermalen Fibroblastenmodell auf die Expression der zirkadianen Gene von Proband:innen mit einer ADHS-Diagnose aus?\*
- Inwiefern verändert die Verabreichung von Triiodthyronin (T3) die Expression des TSH-Rezeptors bei humanen dermalen Fibroblasten von Proband:innen mit einer ADHS-Diagnose?

---

\* Parallel zu dieser Forschungsarbeit wurde auch der Einfluss von T3 auf die zirkadiane Genexpression in HDF-Kulturen von Proband:innen ohne neuropsychiatrische Erkrankung untersucht.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Allgemeine Aspekte**

Die Erhebung der Daten dieser Dissertation erfolgte im Rahmen der Arbeitsgruppe für Molekulare Psychiatrie im Fachbereich Psychiatrie und Psychotherapie. Forschungsschwerpunkt dieser Arbeitsgruppe ist unter anderem die Untersuchung des Einflusses verschiedener Substanzen auf die zirkadiane Rhythmik in humanen dermalen Fibroblasten von Proband:innen ohne neuropsychiatrische Erkrankung und Studienteilnehmer:innen mit der Diagnose ADHS.

### **2.2. Studienteilnehmer:innen**

Alle Studienteilnehmer:innen willigten schriftlich in die Teilnahme an der Studie ein, welche in Übereinstimmung mit den ethischen Richtlinien der Deklaration von Helsinki durchgeführt wurde. Die Genehmigung zur Durchführung der Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität Rostock (Registernummer: A2013-159) erteilt.

Für die Untersuchung der Wirkung von Fluvoxamin wurden 12 Proband:innen ohne neuropsychiatrische Erkrankung ausgewählt. Für die Untersuchung von T3 wurden 12 Proband:innen ohne neuropsychiatrische Erkrankung sowie 12 Teilnehmer:innen mit ADHS-Diagnose rekrutiert.

In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Untersuchung der Wirkung von Fluvoxamin in humanen dermalen Fibroblasten von Proband:innen ohne neuropsychiatrische Erkrankung sowie auf der Wirkung von T3 im Fibroblastenmodell von Proband:innen mit einer ADHS-Diagnose. Parallel zu dieser Forschungsarbeit wurde in einer anderen Doktorarbeit der Einfluss von T3 auf die zirkadiane Genexpression in HDF-Kulturen von Proband:innen ohne neuropsychiatrische Erkrankung untersucht. Da diese Daten nicht primärer Bestandteil dieser Doktorarbeit waren, werden die Ergebnisse nur in der Diskussion aufgegriffen und die graphischen Darstellungen zur Expression der zirkadianen Gene im Anhang gezeigt.

Die ADHS-Diagnostizierung erfolgte durch auf diesem Gebiet erfahrene Psychiater:innen unter Verwendung der Wender Utah Rating Scale (WURS-k) und gemäß der DSM-IV und ICD-10 Kriterien. Die Proband:innen nahmen vor und während der Studie keine Medikation zur Behandlung von neuropsychiatrischen Erkrankungen ein. Von der Teilnahme ausgeschlossen

wurden im Schichtdienst arbeitende Personen und Schwangere oder stillende Mütter. Es wurden ausschließlich Proband:innen zugelassen, bei denen keine weiteren eigenständigen psychiatrischen Erkrankungen oder Schlafstörungen (akut oder in der Vergangenheit) bekannt waren, welche stärker ausgeprägt waren als die ADHS.

Das allgemeine Intelligenzniveau der Proband:innen wurde mithilfe des MWT (Mehrfachwahl-Wortschatz-Intelligenztest) ermittelt. Die Bestimmung der Chronotypen erfolgte mithilfe des D-MEQ Fragebogens (Morning-Eveningness-Questionnaire, deutsche Version).

## 2.3. Materialien

### 2.3.1. Zellkulturmedien und -lösungen

Name	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Liberase	Roche, Basel, CHE
Fetal Bovine Serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Penicillin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypanblau (0,4%)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypsin-EDTA (0,05%)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

### 2.3.2. Medikamente

Name	Hersteller
Dexamethason	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fluvoxamin	Neuraxpharm, Langenfeld, DEU
Triiodthyronin (T3)	Merck Millipore, Darmstadt, DEU

### 2.3.3. Kits

Name	Hersteller
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden, DEU
Superscript III First-Strand Synthesis System	Invitrogen, Carlsbad, USA
PerfeCTa SYBR Green Fast Mix	Quantabio, Beverly, USA

### 2.3.4. Primer für qRT-PCR

Alle Primer stammten von der Firma Eurofins (Alameda, USA).

Gene	Primer-Sequenz Forward (5'-3')	Primer-Sequenz Reverse (5'-3')
<i>Clock</i>	CCAGCAGTTTCATGAGATGC	GAGGTCATTTTCATAGCTGAGC
<i>Bmal1</i>	AAGGATGGCTGTTTCAGCACATGA	CAAAAATCCATCTGCTGCCCTG
<i>Per1</i>	TGGGGACAACAGAACAGAGAA	AGGACACTCCTGCGACCA
<i>Per2</i>	GTATCCATTCATGCTGGGCT	TCGTTTGAAGTGCAGGTGAC
<i>Per3</i>	TCAGTGTTTGGTGGGAAGGAA	TCTGGGTCAGCAGCTCTACA
<i>Cry1</i>	CACGAATCACAAACAGACGG	TACATCCTGGACCCCTGGT
<i>TSHR</i>	CCTCCTAAATTCCTTGGCATT	AGGTAACAFCATCCAGCTTTG
<i>Rpl13a</i>	GCCAGAAATGTTGATGCCTT	AGATGGCGGAGGTGCAG
<i>Rpl19a</i>	GTGGCAAGAAGAAGGTCTGG	GCCCATCTTTGATGAGCTTC
<i>Gapdh</i>	GAAGGTGAAGGTCGGAGT	GAAGATGGTGATGGGATTC

### 2.3.5. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
sterile Werkbank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Inkubator	Memmert, Schwabach DEU
-80°C Kühltank "Cryo Cube"	Eppendorf, Hamburg, DEU
-20°C Kühltank	Bosch, Gerlingen, DEU
Dispergierer T10 basic Ultra-Turrax	IKA, Staufen, DEU
Tischzentrifuge	Hettich, Tuttlingen, DEU
Zentrifuge 5430 R	Eppendorf, Hamburg, DEU
Spektrophotometer Multiskan GO	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Spektralphotometrische µDrop Platte	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermocycler, Vapo.protect Mastercycler Pro	Eppendorf, Hamburg, DEU
CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System	Biorad, Hercules, USA
Zentrifuge Mini Plate Spinner MPS 1000	Labnet, Edison, USA
Regelbarer Vortexer RS-VA 10	Phoenix Instrument, Garbsen, DEU
Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, DEU
Wasserbad	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Einmal-Hämacytometer (C-Chip)	NanoEntek, Seoul, KOR
Petry-Schale	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

### 2.3.6. Software

Name	Entwickler
SkanIt RE for Multiskan GO 3.2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Bio-Rad CFX Manager 3.0	Biorad, Hercules, USA
LinRegPCR	Heart Failure Research Center, Amsterdam, NLD
CircWave V1.4	Euclock, München, DEU
SPSS	IBM Corporation, New York, USA

## 2.4. Methoden

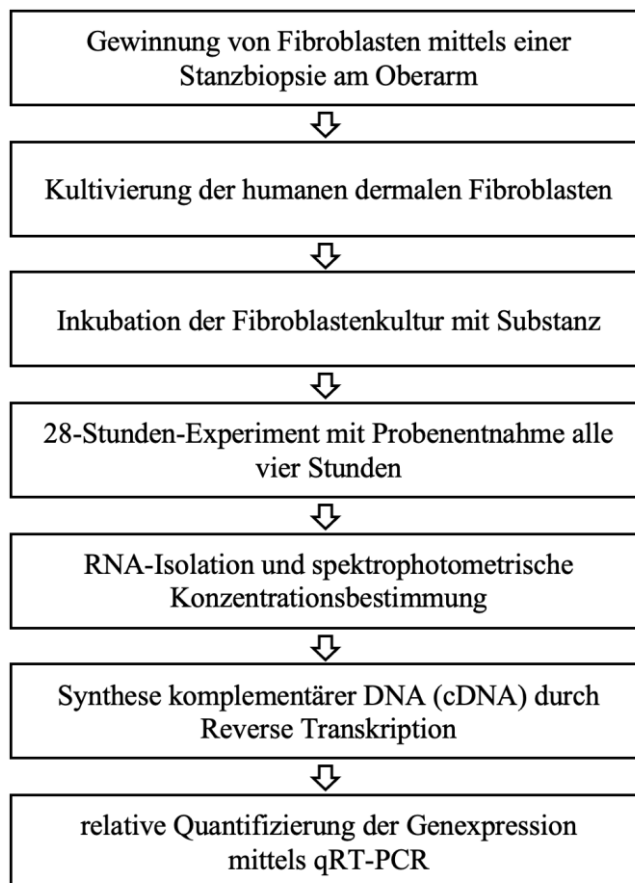


Abbildung 4: Versuchsablauf

### 2.4.1. Kultivierung humaner dermalen Fibroblasten

Als Grundlage für die Isolierung und Kultivierung diente das Protokoll von Takashima (1998).

Wie in Abschnitt 2.2. erwähnt, wurden für die Untersuchung der Wirkung von Fluvoxamin 12 Proband:innen ohne neuropsychiatrische Erkrankung ausgewählt. Für die Untersuchung von T3 wurden 12 Proband:innen ohne neuropsychiatrische Erkrankung sowie 12 Proband:innen mit ADHS-Diagnose rekrutiert. Für die Untersuchung der Substanzen lagen somit jeweils 12 humane dermale Fibroblastenkulturen von Teilnehmer:innen ohne neuropsychiatrische Erkrankung (Fluvoxamin [diese Arbeit], T3 [parallele Arbeit]) und 12 humane dermale Fibroblastenkulturen von Teilnehmer:innen mit einer ADHS-Diagnose (T3 [diese Arbeit]) vor.

Zur Gewinnung dermalen Fibroblasten erfolgte bei den Proband:innen eine Haut-Stanzbiopsie am Oberarm. Die Biopsie wurde in Lokalanästhesie (Emla-Pflaster) durchgeführt. Nach der Entnahme wurde die Probe mit 1 - 2 ml PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Probe in 2 ml Kulturmedium (DMEM mit 20% FBS und 1/100 Antibiotika) mit Liberase für drei Stunden. Das Enzym Liberase führt dabei zur Freisetzung der Fibroblasten aus dem Gewebeverband (Heymer A, Jany C, Kaufmann M., 2009). Die Probe wurde erneut mit PBS gewaschen, mithilfe eines chirurgischen Skalpells in kleine Stücke geschnitten und anschließend für vier Tage in Kulturmedium inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Nach jeweils drei bis vier Tagen erfolgte ein Mediumwechsel. Die Konfluenz der Zellen wurde dabei unter dem Mikroskop kontrolliert. Nach Ablauf von 10 Tagen wurde DMEM mit 5% FBS als Zellkulturmedium verwendet.

Sobald eine Kultur die Konfluenz erreichte, erfolgte die Passagierung. Dafür wurde das alte Medium entfernt, die Fibroblastenkultur zweimal mit PBS gewaschen und mit 0,5 ml Trypsin-EDTA für fünf Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mittels eines Zellschabers von der Oberfläche der Zellkulturflasche gelöst. Das Ablösen der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und die Reaktion mit 1 ml DMEM gestoppt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension in ein Eppendorf Tube überführt und für 10 Minuten bei 4°C und 150 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin entfernt, das Zellpellet mit 200 µl DMEM resuspendiert und in Zellkulturflaschen mit frischem DMEM überführt. Nach der Passagierung wurden die Zellkulturen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> weiter kultiviert.

#### **2.4.2. Viabilitätstest**

Zur Überprüfung des Einflusses einer Substanz auf die Viabilität der Zellen, wurde der Trypanblau-Ausschlusstest verwendet (Strober, 2015). Für Fluvoxamin wurden 3 der insgesamt 12 Fibroblastenkulturen der Proband:innen ohne neuropsychiatrische Erkrankung für den Viabilitätstest verwendet. Für T3 wurden 2 der 12 Fibroblastenkulturen der Proband:innen ohne neuropsychiatrische Erkrankung (in einer parallel durchgeführten Forschungsarbeit) und 2 der 12 Fibroblastenkulturen der Gruppe mit einer ADHS-Diagnose für den Viabilitätstest verwendet.

Bei einer Konfluenz der Zellen von etwa 80% wurde der Kultur (2 technische Replikate pro Probe) die entsprechende Medikamentenkonzentration (siehe Tabelle 8 und 9) hinzugefügt und für 24 Stunden inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Die Zellmorphologie wurde direkt nach der Zugabe

des Medikaments und im Verlauf der 24 Stunden beobachtet. Nach 24 Stunden erfolgte die zweimalige Waschung der Zellen mit 1 ml PBS sowie die anschließende Trypsinierung mit 300 µl Trypsin-EDTA. Nach einer Inkubation bei 37°C für 5 Minuten wurden 600 µl Medium hinzugegeben, um die Reaktion zu stoppen. Das Medium samt Zellen wurde, nach dem Überführen in Eppendorf Tubes, für 5 Minuten bei 100 x g zentrifugiert. Nun wurden die, durch die Zentrifugation gebildeten, Zellpellets in ein Eppendorf Tube überführt und mit 100 µl Medium versetzt. Nach gründlichem Invertieren wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl 0,4-prozentiger Trypanblau-Lösung vermischt und für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden 10 µl dieser Lösung in die Zählkammer gegeben und mikroskopiert.

Das Trypanblau dringt nur in Zellen ein, deren Zellmembran defekt ist. Somit werden tote Zellen blau gefärbt, wohingegen lebende Zellen ungefärbt bleiben. Die Zellen wurden in vier Großquadraten (ein Großquadrat entspricht 16 Kleinquadraten) ausgezählt und unter Berücksichtigung der Verdünnung (Verdünnungsfaktor = 2) hochgerechnet. Anschließend erfolgte die Berechnung der Zellviabilität über folgende Formeln:

$$\text{Zellen pro ml} = \frac{\text{Zellen in 4 Großquadraten}}{4 \times 2 (\text{Verdünnungsfaktor}) \times 10^4 (\text{Volumenfaktor})}$$

$$\text{Zellviabilität (\%)} = \frac{\text{Gesamtzahl der lebensfähigen Zellen pro ml}}{\text{Gesamtzahl der Zellen pro ml}} \times 100$$

### 2.4.3. 28-Stunden-Experiment

Für das 28-Stunden-Experiment sowie die folgenden Experimente (RNA-Isolierung, cDNA-Synthese, qRT-PCR) lagen 12 humane dermale Fibroblastenkulturen von Proband:innen ohne neuropsychiatrische Erkrankung für die Untersuchung von Fluvoxamin und 12 humane dermale Fibroblastenkulturen von Proband:innen mit einer ADHS-Diagnose für die Untersuchung von T3 vor.

Die Inkubation fand stets in einem befeuchteten Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> statt. Nach Erreichen der Konfluenz wurde die primäre Fibroblastenkultur in 8 Kulturflaschen (1 Kulturflasche pro Zeitpunkt) passagiert. Sobald diese Kulturen wiederum die Konfluenz erreichten, wurden sie mit PBS gewaschen und mit 2 ml Medium mit der jeweilig ausgewählten Substanzkonzentration (siehe Tabelle 2) für 24 Stunden inkubiert. Nach Ablauf der 24 Stunden

erfolgte die Synchronisation der Fibroblasten für 30 Minuten mit 100 nM Dexamethason in DMEM. Nach 30 Minuten wurden die Proben mit PBS gewaschen und jeweils 2 ml Kulturmedium hinzugefügt. Nach 30 Minuten erfolgte außerdem die erste Probenentnahme. Anschließend wurde über einen Zeitraum von 28 Stunden alle 4 Stunden eine Probe entnommen und bei -20°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert. Vor Entnahme der entsprechenden Probe, wurde die Kultur mikroskopisch begutachtet, um eine Apoptose der Zellen auszuschließen.

<b>Zeitpunkt</b>	ZP 0	ZP 4	ZP 8	ZP 12	ZP 16	ZP 20	ZP 24	ZP 28
<b>Zeit nach Dexamethason-Synchronisation</b>	30 min	4 h	8 h	12 h	16 h	20 h	24 h	28 h

**Tabelle 1: Zeitpunkte (ZP) der Probenentnahme**

Zu den jeweiligen Zeitpunkten der Probenentnahme wurde 0,5 ml Lösung D (4,5 M Guanidiniumthiocyanat, 0,5 % Natrium-N-Laurylsarcosin, 25 mM Tri-Natriumcitrat, 0,1 M Betamercaptoethanol) zu den Kulturen hinzugegeben und die Kultur in ein Eppendorf Tube überführt. Nach Beendigung des 28-Stunden-Experiments wurden die Proben bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert.

<b>Medikament</b>	<b>Konzentration im Experiment</b>
Fluvoxamin	5 µM
Fluvoxamin	10 µM
T3	100 nM

**Tabelle 2: Konzentrationen der im Experiment verwendeten Substanzen**

#### **2.4.4. RNA-Isolierung und Quantifizierung**

Die RNA-Isolierung erfolgte mithilfe des „RNeasy Plus Mini Kit“ der Firma Qiagen (Qiagen GmbH, 2019). Die Durchführung erfolgte wie im Benutzerhandbuch beschrieben.

Die Proben wurden gevortext und mithilfe eines Dispergiergeräts homogenisiert. Danach erfolgte die Eliminierung der genomischen DNA durch einminütiges Zentrifugieren bei 10.000 rpm in gDNA-Eliminator-Spin-Columns. Dabei wurde die genomische DNA an die Membran gebunden. Zu dem gewonnenen Zentrifugat wurde 70% Ethanol im Verhältnis 1:1 hinzugefügt und durch vortexen und invertieren gemischt. Das Gemisch wurde anschließend in RNeasy-Spin-Columns überführt und 1 Minute zentrifugiert, wobei der Durchfluss verworfen wurde. Nun erfolgte die Waschung durch einmalige Zentrifugation mit 700 µl RW1-Puffer und

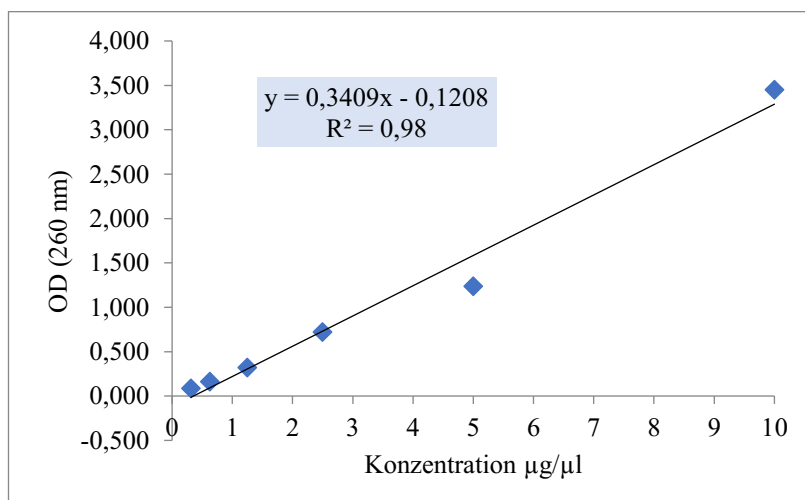
zweimalige Zentrifugation mit 500 µl RPE-Puffer. Zur Trocknung erfolgte eine Zentrifugation bei 12.000 rpm über 1 Minute, wobei die RNeasy-Spin-Columns in neue 2 ml Tubes überführt wurden. Durch das Hinzufügen von 8 - 13 µl RNase freiem Wasser auf die Membran und Zentrifugierung (14.000 rpm, 21°C, 1 Minute), wurde die RNA schließlich gelöst und in 1,5 ml Tubes aufgefangen.



**Abbildung 5: Ablauf der RNA-Isolierung (modifiziert nach RNeasy Mini Handbook (Qiagen GmbH, 2019))**

Anschließend wurde die Konzentration der extrahierten RNA mittels Spektrophotometrie bestimmt. Dabei wurde je 1 µl RNA auf eine µDrop-Platte pipettiert. Für jede Probe wurden zwei technische Replikate zur Bestimmung der RNA-Konzentration verwendet. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 260 nm und 280 nm. Bei der Wellenlänge von 260 nm besitzen Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum, bei einer Wellenlänge von 280 nm gilt das für Protein. Aus den Werten wurde der Quotient berechnet. Ein Quotient über 1,8 wurde als ausreichend bewertet (Arnemann, 2019). Die Proben wurden bei -80°C bis zur Weiterverwendung tiefgefroren.

$$\text{RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{(\text{A}_{260} - \text{Blank}) + 0,1208}{0,3409}$$



**Abbildung 6: Eichgerade zur RNA-Konzentrationsbestimmung**

#### 2.4.5. Herstellung der cDNA (Reverse Transkription)

Im nächsten Schritt erfolgte die Synthese der extrahierten mRNA in komplementäre DNA (cDNA) mittels reverser Transkription. Für die Synthese der cDNA wurde das „SuperScript III First-Strand Synthesis System“ von Invitrogen verwendet.

Zuerst wurden für die 8 Proben (1 Probe pro Zeitpunkt) RNA-Verdünnungen entsprechend der RNA-Konzentration hergestellt. Dabei wurde jeweils 1 µg RNA auf ein Volumen von 2,5 µl mit DEPC-behandeltem Wasser verdünnt.

$$\text{RNA } (\mu\text{l}) = \frac{0,98}{\text{RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l})}$$

Zusätzlich wurde eine negative Kontrolle angefertigt, bei der im ersten Schritt 2,5 µl Wasser pipettiert wurden. Zur angefertigten RNA-Verdünnung wurde 0,6µl Mix 1 (siehe Tabelle 3) pipettiert und für 5 Minuten bei 65°C im Thermocycler inkubiert und anschließend 1 Minute auf 4°C heruntergekühlt. Nun wurden 3,3 µl Mix 2 (siehe Tabelle 4) hinzugefügt. Bei der angefertigten negativen Kontrolle wurde anstelle von SuperScript III Reverser Transkriptase, RNase-freies Wasser pipettiert. Im Anschluss wurden die 9 Proben für 50 Minuten bei 50°C inkubiert. Durch das Erhitzen der Proben für 5 Minuten auf 85°C, wurde die cDNA-Synthese gestoppt. Die Entfernung der RNA erfolgte durch die Inkubation mit RNase H bei 70°C für 20 Minuten.

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>
Oligo(dT)20 (50 nM)	0,3 µl
10 mM dNTP Mix	0,3 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>0,6 µl</b>

**Tabelle 3: Mix 1**

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>
10X RT Buffer	0,7 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,3 µl
0,1 M DTT	0,7 µl
RNase Out (40 U/µl)	0,3 µl
SuperScript III RT (200 U/µl)	0,3 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>3,3 µl</b>

**Tabelle 4: Mix 2 (cDNA-Synthese-Mix)**

Abschließend wurde eine Verdünnung im Verhältnis 1:20 mit RNase-freiem Wasser angefertigt und die Proben bei -80°C gelagert.

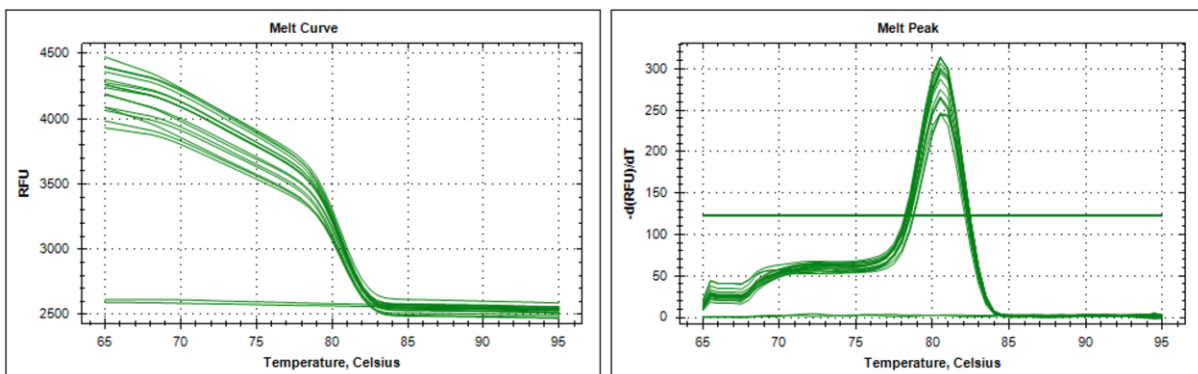
### 2.4.6. Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Zur Vervielfältigung und gleichzeitigen Quantifizierung der cDNA kam die quantitative Echtzeit-PCR (Real Time-PCR) zum Einsatz. Die Quantifizierung wurde mithilfe eines fluoreszierenden Farbstoffes, dem SYBR Green I Farbstoff, durchgeführt. Das Prinzip der quantitativen Echtzeit-PCR beruht dabei auf der Detektion der Fluoreszenz, welche durch die Bindung des SYBR Green I Farbstoffes an doppelsträngige DNA entsteht. Die Vervielfältigung der DNA korreliert somit mit der Zunahme des Fluoreszenz-Signals. Die Anlagerung des Farbstoffes ist dabei zwar unspezifisch, anhand der charakteristischen Schmelzkurven können die PCR-Produkte jedoch voneinander unterschieden werden.

Pro Reaktion wurden 10 µl Sybr Green Fast Mix mit jeweils 1 µl Forward-Primer und Reverse-Primer des zu untersuchenden Gens vermischt. Nun wurden zu 12 µl des Gemischs 8 µl cDNA-Lösung (1:20) hinzugefügt. Nach sorgfältigem Mischen wurden je 10 µl in zwei separate Wells der 96-Well-PCR-Platte pipettiert. Von den zwei technischen Replikaten wurde die Standardabweichung ermittelt. Lag diese höher als 0,5, wurden nochmals zwei technische Replikate der entsprechenden Probe in der qRT-PCR bestimmt und in die Auswertung miteinbezogen.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Aktivierung der DNA-Polymerase	95°C	3 Minuten	1
Denaturierung	95°C	3 Sekunden	40
Annealing und Elongation	60°C	20 Sekunden	
Schmelzkurvenanalyse	65°C - 95°C	5 Sekunden	1

**Tabelle 5: Reaktionsbedingungen der qRT-PCR**



**Abbildung 7: Exemplarische Schmelzkurve der PCR-Analyse von *CryI***

Die Genexpression wurde mithilfe der Delta-Delta-Ct-Methode analysiert (Schmittgen & Livak, 2008). Der Cycle-Threshold-Wert (Ct-Wert) ist das Maß für die DNA-Konzentration der Probe und gibt den PCR-Zyklus an, bei dem das Fluoreszenz-Signal einen vorher definierten Schwellenwert überschreitet. Er wird genutzt, um die untersuchten Gene zu vergleichen.

$$\Delta Ct = Ct (\text{ausgewählter Zeitpunkt}) - Ct (\text{Maximalwert der 8 Zeitpunkte})$$

$$\Delta\Delta Ct = \frac{\Delta Ct (\text{Zielgen})}{\Delta Ct (\text{Referenzgene})}$$

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Folgende Gene wurden mithilfe der relativen Echtzeit-PCR untersucht (Zielgene):

- *Clock*
- *Bmal1*
- *Cry1*
- *Per1-3*
- *TSHR*

Als Referenzgene dienten die Housekeeping-Gene *Rpl13* (*Ribosomal Protein L13*), *Rpl19* (*Ribosomal Protein L19*) und *Gapdh* (*Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase*). Neben den Positivkontrollen, wurde stets auch eine Negativkontrolle durchgeführt.

Nach Beendigung der Experimente wurde die Primer-Effizienz berechnet. Die Proben, bei denen die gleichen Primer verwendet werden, bezeichnet man als Amplikongruppe. Mithilfe des Programms „LinRegPCR“ wurde, über die Verwendung der Ct-Werte, die mittlere Primer-Effizienz für jede Amplikongruppe ermittelt.

#### **2.4.7. Statistische Auswertung**

Die Analyse der Genexpressionsdaten auf eine signifikante zirkadiane Rhythmik erfolgte mithilfe des Programms CircWave unter Verwendung einer linearen harmonischen Regressionsanpassung. Hierbei werden die Daten der Messreihe einer Sinusfunktion mit einer Periodendauer von 24 Stunden angepasst. Für alle Gene, deren Messreihen ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  ergaben, wurde eine rhythmische Expression angenommen.

Die Interferenzstatistik wurde unter Verwendung des Programms SPSS durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde für alle Tests auf 5% festgelegt ( $p < 0,05$ ).

Für die Analyse der qRT-PCR-Daten für die Fluvoxamin-Studie kam der t-Test für unabhängige Stichproben zum Einsatz. Die Normalverteilung konnte mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests bestätigt werden ( $p > 0,05$ ). Die Unterschiede in der zirkadianen Genexpression zwischen den Chronotypgruppen wurde mittels einseitiger ANOVA und Post-hoc-Test mit Bonferroni-Korrektur untersucht.

Die Daten der T3-Studie wiesen keine Normalverteilung und eine Beteiligung von mehr als zwei Gruppen auf, weshalb der Kruskal-Wallis-H-Test zum Einsatz kam.

Die Genexpressionsdaten wurden mithilfe von Zeitreihenstatistiken analysiert, die jeweils auf 12 Stichproben basieren (wie in 2.2 und 2.4.1 erwähnt), was in diesem statistischen Modell mathematisch ausreichend und somit repräsentativ ist (Menet et al., 2012; Thaben & Westermark, 2016).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Demografische Daten

Für die Untersuchung der zirkadianen Genexpression, unter der *in vitro* Behandlung mit Fluvoxamin, wurde eine Hautbiopsie von 5 männlichen und 7 weiblichen Proband:innen gewonnen. Ein Überblick über die demografischen Daten der Proband:innen ist in Tabelle 6 dargestellt.

Demographische Daten	Proband:innen (n=12)
Alter	48.50 ± 17.72 Jahre
weibliche Patientinnen	7 (58.3 %)
BMI	27.36 ± 7.38
MWT	110.92 ± 9.00
D-MEQ	59.33 ± 8.45
Chronotyp	Neutraltyp 7 (58.3 %) Moderater Morgentyp 4 (33.3 %) Definitiver Morgentyp 1 (8.3 %)

**Tabelle 6: Demografische Daten der Proband:innen ohne neuropsychiatrische Erkrankung für Fluvoxamin-Studie**

Für die Untersuchung der zirkadianen Genexpression, unter der *in vitro* Behandlung mit T3, wurde eine Hautbiopsie von 7 männlichen und 5 weiblichen Proband:innen mit der Diagnose ADHS gewonnen. Ein Überblick über die demografischen Daten der Proband:innen ist in Tabelle 7 dargestellt. Die D-MEQ-Werte lassen die Tendenz erkennen, dass ADHS-Patient:innen eher zu einem Abendtyp neigen als Proband:innen ohne neuropsychiatrische Erkrankung. In einer parallel durchgeführten Forschungsarbeit wurden die Daten der *in vitro* Behandlung mit T3 im HDF-Modell von Proband:innen ohne neuropsychiatrische Erkrankung gewonnen (siehe Tabelle 10).

Demographische Daten	Proband:innen (n=12)
Alter	43.00 ± 18.41 Jahre
weibliche Patientinnen	5 (41.7 %)
BMI	27.86 ± 4.70
MWT	104.75 ± 9.69
D-MEQ	48.08 ± 15.57
Chronotyp	Neutraltyp 4 (33.3 %) Moderater Morgentyp 4 (33.3 %)

	Moderater Abendtyp 2 (16.7 %)
	Definitiver Abendtyp 2 (16.7 %)

**Tabelle 7: Demografische Daten der Proband:innen mit ADHS-Diagnose für T3-Studie**

### 3.2. Viabilität der inkubierten Fibroblasten

Zur Feststellung der Lebensfähigkeit der kultivierten humanen dermalen Fibroblasten wurden die in Tabelle 8 und 9 dargestellten Medikamentenkonzentrationen getestet.

<b>Fluvoxamin-Konzentration</b>	<b>V<sub>Medium</sub> [μl]</b>	<b>V<sub>Fluvoxamin</sub> [μl]</b>
0 μM	2000	0
0,5 μM	2000	1
1 μM	2000	2
5 μM	1990	10
10 μM	1980	20
30 μM	1940	60
50 μM	1900	100

**Tabelle 8: Fluvoxamin Viabilitätstest**

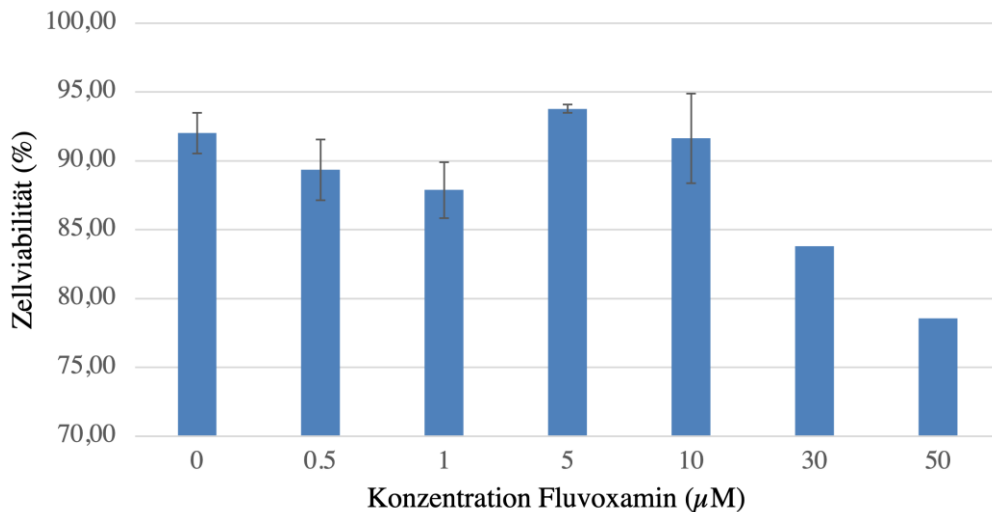
<b>T3-Konzentration</b>	<b>V<sub>Medium</sub> [μl]</b>	<b>V<sub>T3</sub> [μl]</b>
0 nM	2000	0
50 nM	1867	133
100 nM	1734	266
150 nM	1600	400

**Tabelle 9: T3 Viabilitätstest**

Es wurde die Lebensfähigkeit der mit einer Substanz inkubierten Fibroblasten mit derer ohne Medikamentenzugabe verglichen. Die Lebensfähigkeit der mit 30 μM und 50 μM Fluvoxamin behandelten Zellen lag deutlich unter der Lebensfähigkeit der Kontrollzellen ohne Fluvoxamin-Behandlung (0 μM Fluvoxamin). Da schon während des laufenden Experiments unter dem Mikroskop deutlich sichtbar war, dass diese Konzentrationen zu Zellstress und Zelltod führen, wurde der Viabilitätstest mit diesen Konzentrationen kein weiteres Mal wiederholt (keine Standardabweichung in Abbildung 8 dargestellt, da n=1).

Die Lebensfähigkeit, der mit niedrigeren Konzentrationen behandelten Zellen, ähnelte den Kontrollzellen ohne Fluvoxamin (0 μM Fluvoxamin). Dabei wiesen die Fibroblasten bei 5 μM und 10 μM Fluvoxamin die beste Lebensfähigkeit (0,5 μM Fluvoxamin: 89,35 ± 2,21%; 1 μM

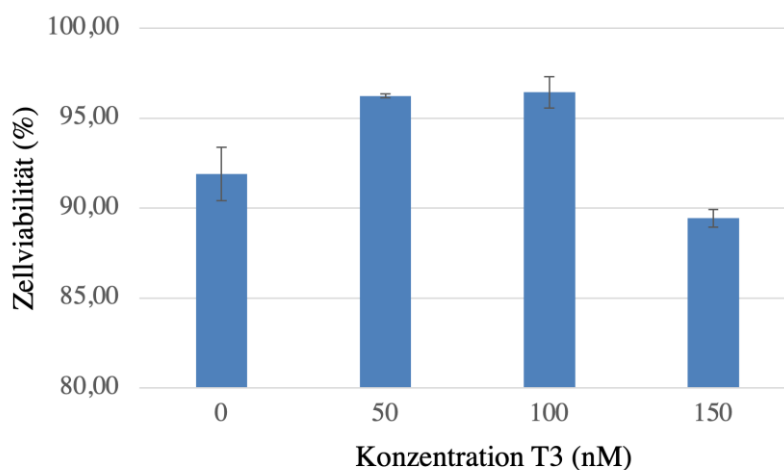
Fluvoxamin:  $87,88 \pm 2,03\%$ ; 5  $\mu\text{M}$  Fluvoxamin:  $93,78 \pm 0,3\%$ ; 10  $\mu\text{M}$  Fluvoxamin:  $91,63 \pm 5,26\%$ , Mittelwert  $\pm$  SD) im Vergleich zu den Kontrollzellen ohne Fluvoxamin (0  $\mu\text{M}$  Fluvoxamin:  $92,02 \pm 1,47\%$ , Mittelwert  $\pm$  SD) auf. Die Lebensfähigkeit, der mit 5  $\mu\text{M}$  inkubierten Zellen, zeigte einen geringfügigen Anstieg im Vergleich zu den Kontrollzellen.



**Abbildung 8: Ergebnisse Zellviabilitätstest nach der Inkubation mit Fluvoxamin, n=3**

Dargestellt ist in Abbildung 8, wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben, die Viabilität von drei HDF-Kulturen von Proband:innen ohne neuropsychiatrische Erkrankung.

Die Lebensfähigkeit der mit 50 nM und 100 nM T3 behandelten Zellen (50 nM T3:  $96,24 \pm 0,11\%$ ; 100 nM T3:  $96,45 \pm 0,87\%$ ; 150 nM T3:  $89,45 \pm 0,49\%$ , Mittelwert  $\pm$  SD) war höher im Vergleich zu den Kontrollzellen ohne Inkubation mit T3 (0 nM T3:  $91,91 \pm 1,48\%$ , Mittelwert  $\pm$  SD). Der Viabilitätstest ergab für 100 nM T3 die höchste Lebensfähigkeit.



**Abbildung 9: Ergebnisse Zellviabilitätstest nach der Inkubation mit T3, n=4**

Dargestellt ist in Abbildung 9, wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben, die Viabilität von zwei HDF-Kulturen aus der Gruppe der Proband:innen mit einer ADHS-Diagnose sowie von zwei HDF-Kulturen von Proband:innen ohne neuropsychiatrische Erkrankung.

### **3.3. Auswirkungen von Fluvoxamin auf die zirkadiane Genexpression**

#### **3.3.1. Fluvoxamin beeinflusst die zirkadiane Genexpression von *Cry1* und *Per1-3***

Um die molekulare Rhythmik zu untersuchen, wurde die Expression von Genen aus dem positiven, transkriptionsfördernden (*Clock*, *Bmal1*) und dem negativen, transkriptionshemmenden Teil (*Cry1*, *Per1-3*) der Rückkopplungsschleife bestimmt. Dabei wurden mit 5  $\mu$ M Fluvoxamin behandelte (Versuchsgruppe) und unbehandelte Fibroblasten (0  $\mu$ M Fluvoxamin, Kontrollgruppe) von Proband:innen ohne neuropsychiatrische Diagnose untersucht und miteinander verglichen. Zu Beginn führten wir auch Experimente mit 10  $\mu$ M Fluvoxamin durch. Da sich jedoch bei der Inkubation mit 5  $\mu$ M Fluvoxamin stärkere Effekte zeigten, beschränkten wir uns im Verlauf auf die Experimente mit dieser Konzentration.

Die Expression von *Bmal1*, *Cry1*, *Per1-3* war in beiden Gruppen (0  $\mu$ M und 5  $\mu$ M Fluvoxamin) rhythmisch (CircWave,  $p < 0,05$ ). Nach Inkubation mit 5  $\mu$ M Fluvoxamin war keine Rhythmizität von *Clock* gegenüber der Kontrollgruppe (0  $\mu$ M Fluvoxamin) festzustellen.

Die Daten waren normalverteilt ( $p > 0,05$ ). Statistisch signifikante Unterschiede in der zirkadianen Genexpression zwischen der Kontroll- (0  $\mu$ M) und Versuchsgruppe (5  $\mu$ M Fluvoxamin) ergaben sich für *Cry1* zum Zeitpunkt 4 ( $t(22) = 2,33$ ,  $p = 0,029$ ) und Zeitpunkt 20 ( $t(22) = -2,39$ ,  $p = 0,026$ ), für *Per1* zum Zeitpunkt 4 ( $t(21) = -2,56$ ,  $p = 0,018$ ), für *Per2* zum Zeitpunkt 4 ( $t(21) = -2,46$ ,  $p = 0,023$ ) und für *Per3* zum Zeitpunkt 0 ( $t(22) = -2,74$ ,  $p = 0,012$ ). Die detaillierten Angaben zu Mittelwerten und Standardabweichungen sind in Tabelle 11 im Anhang angegeben.

Für *Bmal1* und *Cry1* wurde eine Phasenverschiebung um 4 Stunden durch den Einfluss von Fluvoxamin sichtbar, welche allerdings nur für *Cry1* eine statistische Signifikanz zeigte (siehe Abbildung 10). Fluvoxamin sorgte für eine Erhöhung der Expression von *Per1* und *Per2* zum Zeitpunkt 4, sowie von *Per3* zum Zeitpunkt 0 im Vergleich zu den Kulturen der Kontrollgruppe (0  $\mu$ M Fluvoxamin).

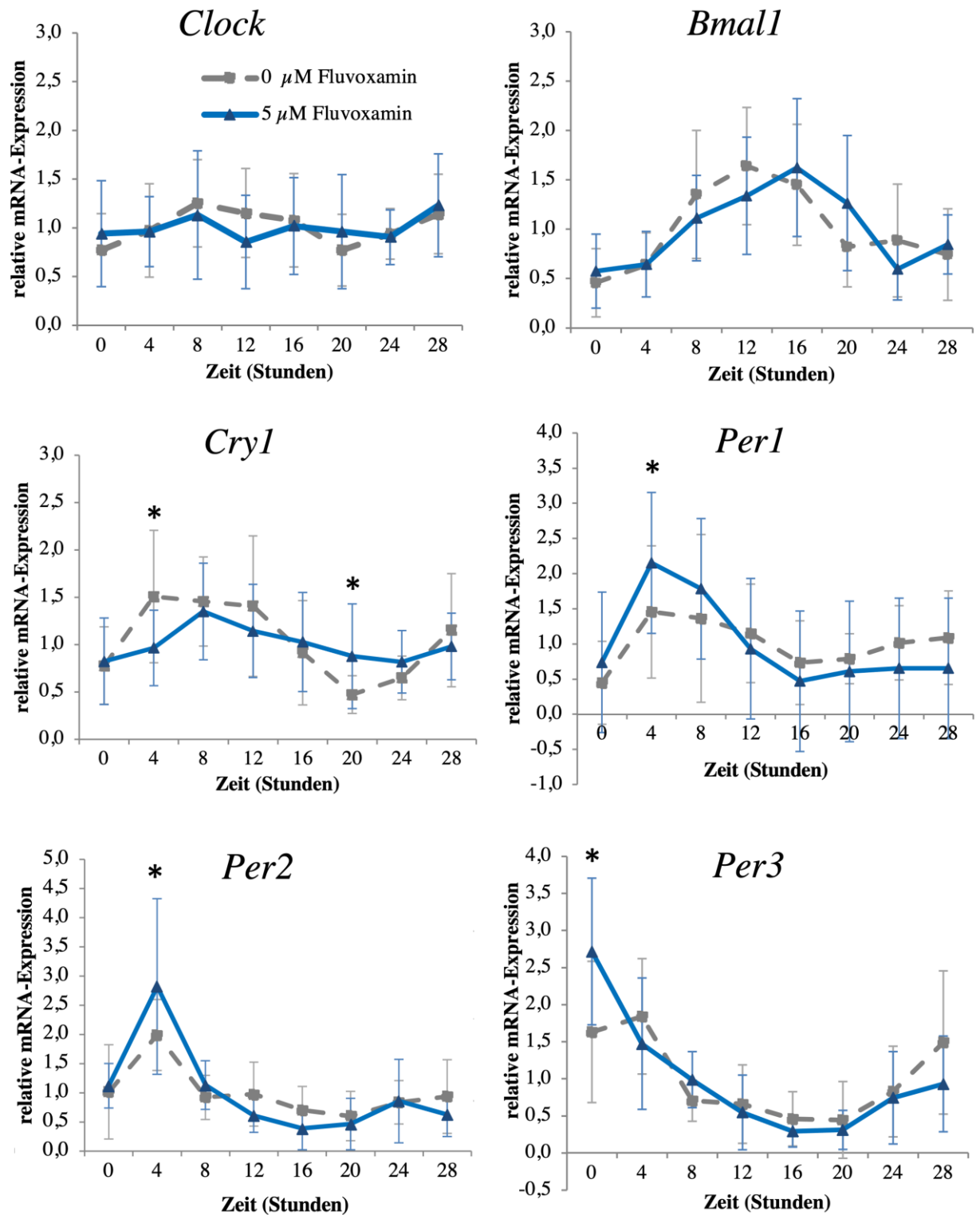


Abbildung 10: Relative mRNA-Genexpression der zirkadianen Gene bei Proband:innen ohne neuropsychiatrische Diagnose nach Inkubation mit 0 μM und 5 μM Fluvoxamin, n=12. \* $p < 0.05$

### 3.3.2. Chronotyp und zirkadiane Genexpression

Unter den Proband:innen ohne neuropsychiatrische Diagnose wiesen 58,3 % eine neutrale zirkadiane Präferenz auf, während 33,3 % eine mäßige und 8,3 % eine ausgeprägte Morgenpräferenz zeigten. Die Stichprobengröße für die folgende Analyse, aufgeschlüsselt nach Chronotypen, ist gering, weshalb sich lediglich Tendenzen abzeichnen.

Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen den Chronotypen (Neutraltyp und Morgentyp) und der zirkadianen Expression in einem ANOVA basierten Vergleich zwischen den Gruppen für *Bmal1* (ZP 4:  $F = 3,303$ ,  $p = 0,041$ ; ZP 16:  $F = 4,188$ ,  $p = 0,019$ ; ZP 20:  $F = 3,188$ ,  $p = 0,046$ ), für *Cry1* (ZP 4:  $F = 5,286$ ,  $p = 0,008$ ) und für *Per3* (ZP 0:  $F = 3,175$ ,  $p = 0,047$ ). Die detaillierten Angaben zu Mittelwerten und Standardabweichungen sind in Tabelle 12 im Anhang angegeben.

Es zeigte sich, dass für *Bmal1* bei Proband:innen mit einem neutralen Chronotyp eine höhere Expression vorlag als bei solchen mit Morgentyp. Auch nach der Zugabe von Fluvoxamin änderte sich dies nicht. Auch für *Cry1* zeigte der Neutraltyp gegenüber dem Morgentyp eine höhere Expression, wobei die Zugabe von Fluvoxamin diesen Unterschied dämpfte. In Bezug auf die Expression von *Per3*, sorgte die Gabe von Fluvoxamin für einen Anstieg der Genexpression bei Proband:innen mit neutralen Chronotypen zum Zeitpunkt 0 (siehe Abbildung 11).

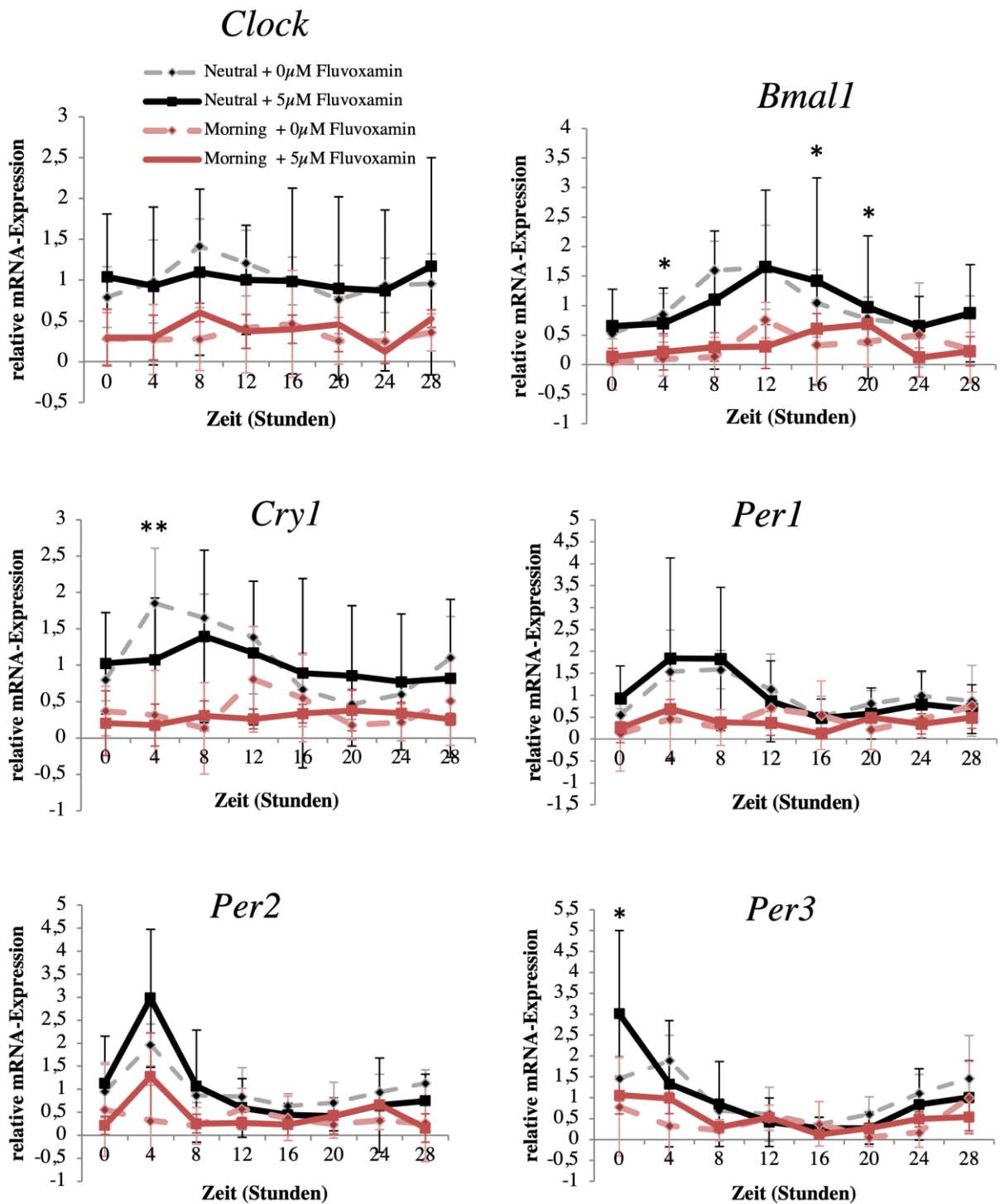


Abbildung 11: Relative mRNA-Genexpression von zirkadianen Genen bei Proband:innen ohne neuropsychiatrische Diagnose nach Inkubation mit 0 μM und 5 μM Fluvoxamin für neutrale zirkadiane Präferenz (n=7) und Morgenpräferenz (n=5). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$

### 3.4. Auswirkungen von Triiodthyronin auf die zirkadiane Genexpression

#### 3.4.1. T3 verändert die zirkadiane Genexpression von ADHS-Patient:innen

In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss die Inkubation mit T3 auf die zirkadiane Genexpression von Fibroblasten hat, welche von Proband:innen mit diagnostizierter ADHS stammen. Dabei wurden mit 100 nM T3 behandelte (Versuchsgruppe) und unbehandelte Fibroblasten (0 nM T3, Kontrollgruppe) untersucht und miteinander verglichen.

Da die Daten, der mit T3-behandelten HDF-Kulturen von Proband:innen ohne neuropsychiatrische Erkrankung, nicht primärer Bestandteil dieser Doktorarbeit waren, werden diese Ergebnisse nur in der Diskussion dargelegt und die graphischen Darstellungen zur Expression der zirkadianen Gene im Anhang gezeigt.

Die Expression von *Per2* und *Per3* war in beiden Gruppen (0 nM und 100 nM T3) rhythmisch (CircWave,  $p < 0,005$ ). Keine Rhythmizität ließ sich bei der Expression von *Clock* in beiden Gruppen feststellen (CircWave,  $p > 0,05$ ). Durch eine Inkubation mit 100 nM T3 ging die Rhythmizität von *Bmal1*, *Cry1* und *Per1* gegenüber der Kontrollgruppe (0 nM T3) verloren (CircWave,  $p > 0,05$ ).

Statistisch signifikante Unterschiede in der zirkadianen Genexpression zwischen der Kontroll- (0 nM) und Versuchsgruppe (100 nM T3) ergaben sich für *Clock* zum Zeitpunkt 12 ( $H(3) = 8,324$ ,  $p = 0,040$ ) und für *Bmal1* zum Zeitpunkt 0 ( $H(3) = 10,224$ ,  $p = 0,017$ ), zum Zeitpunkt 8 ( $H(3) = 13,160$ ,  $p = 0,004$ ), zum Zeitpunkt 12 ( $H(3) = 14,330$ ,  $p = 0,002$ ) und zum Zeitpunkt 28 ( $H(3) = 9,698$ ,  $p = 0,021$ ). Auch für *Cry1* zeigten sich signifikante Unterschiede zum Zeitpunkt 4 ( $H(3) = 15,050$ ,  $p = 0,002$ ), zum Zeitpunkt 8 ( $H(3) = 11,168$ ,  $p = 0,011$ ), zum Zeitpunkt 20 ( $H(3) = 12,361$ ,  $p = 0,006$ ), zum Zeitpunkt 24 ( $H(3) = 13,403$ ,  $p = 0,004$ ) und zum Zeitpunkt 28 ( $H(3) = 11,182$ ,  $p = 0,011$ ). Für *Per1* ergaben sich signifikante Unterschiede für den Zeitpunkt 0 ( $H(3) = 14,233$ ,  $p = 0,003$ ), für den Zeitpunkt 4 ( $H(3) = 10,912$ ,  $p = 0,012$ ), den Zeitpunkt 8 ( $H(3) = 13,997$ ,  $p = 0,003$ ), den Zeitpunkt 16 ( $H(3) = 8,871$ ,  $p = 0,031$ ), den Zeitpunkt 20 ( $H(3) = 9,660$ ,  $p = 0,022$ ) und für den Zeitpunkt 28 ( $H(3) = 8,870$ ,  $p = 0,031$ ). Es ergaben sich außerdem signifikante Unterschiede in den Expressionsniveaus von *Per2* für den Zeitpunkt 4 ( $H(3) = 14,455$ ,  $p = 0,002$ ), den Zeitpunkt 8 ( $H(3) = 9,300$ ,  $p = 0,026$ ) und den Zeitpunkt 24 ( $H(3) = 16,854$ ,  $p = 0,001$ ), sowie für *Per3* für den Zeitpunkt 0 ( $H(3) = 9,859$ ,  $p = 0,020$ ), den Zeitpunkt 4 ( $H(3) = 7,872$ ,  $p = 0,049$ ) und den Zeitpunkt 24 ( $H(3) = 10,256$ ,  $p =$

0,017). Die detaillierten Angaben zu Mittelwerten und Standardabweichungen sind in Tabelle 13 im Anhang angegeben.

Es zeigte sich eine verringerte Expression von *Clock* zum Zeitpunkt 12 durch den Einfluss von T3. *Per1* wies eine Phasenverschiebung von etwa 8 Stunden auf sowie eine Verkürzung des Expressionsplateaus. Die Gene *Bmal1*, *Cry1*, *Per2* und *Per3* zeigten eine Phasenverschiebung um 12 - 16 Stunden nach T3-Inkubation (siehe Abbildung 12).

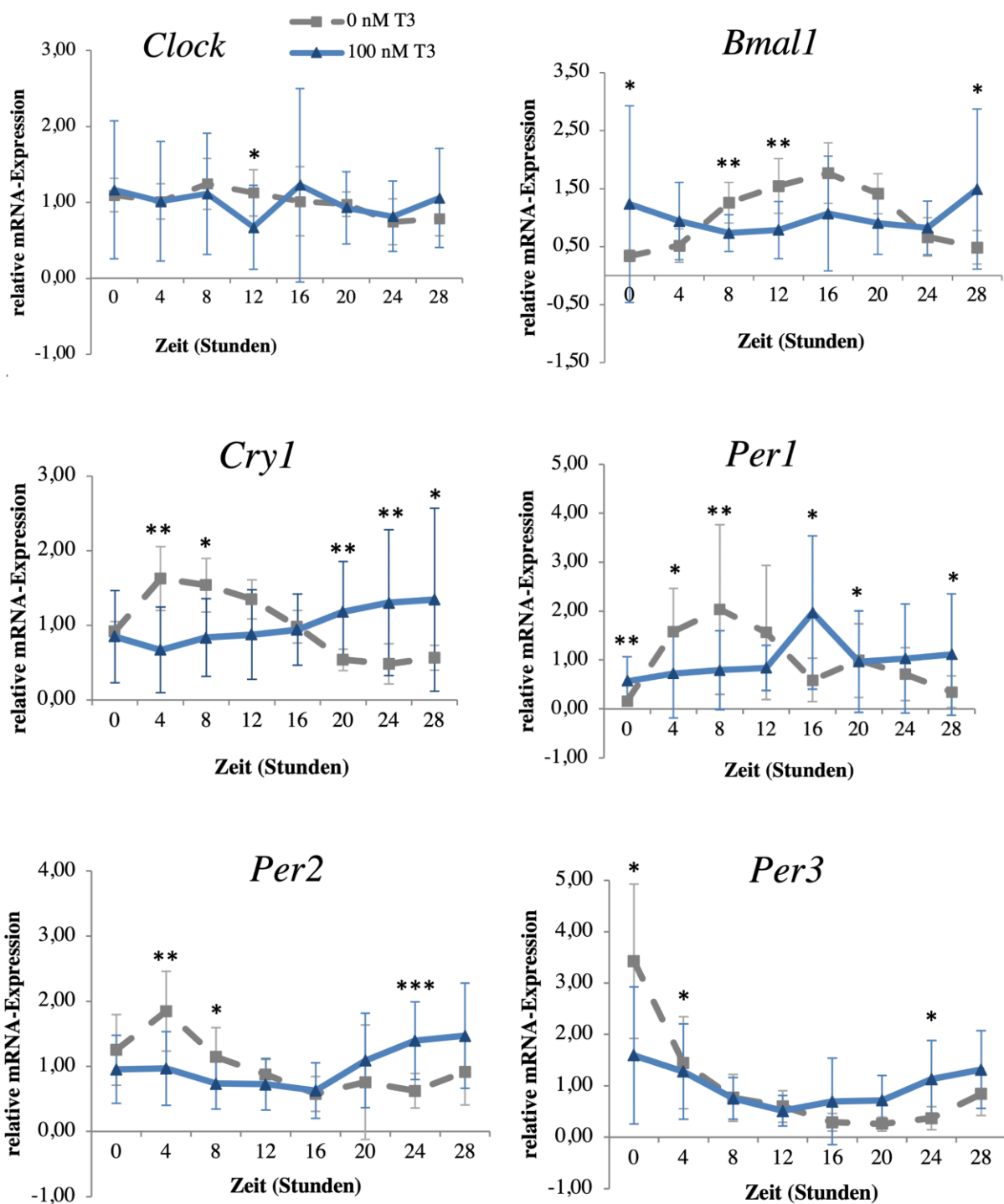


Abbildung 12: Relative mRNA-Genexpression von zirkadianen Genen bei Proband:innen mit diagnostizierter ADHS nach Inkubation mit 0 nM und 100 nM T3, n=12. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

### 3.4.2. Auswirkungen von T3 auf die Expression des Thyreotropin-Rezeptors

Die Expression des TSH-Rezeptors wurde in, mit 100 nM T3 behandelten (Versuchsgruppe) und unbehandelten (0 nM T3, Kontrollgruppe), Fibroblasten von ADHS-Patient:innen untersucht und miteinander verglichen.

Ein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression des TSH-Rezeptors zwischen Versuchs- (100 nM T3) und Kontrollgruppe (0 nM T3) ergab sich für den Zeitpunkt 20 (H(3) = 9,644,  $p = 0,022$ ). T3 sorgte für eine erhöhte Expression des TSH-Rezeptors zum Zeitpunkt 20 im Vergleich zu den Kulturen ohne T3-Inkubation.

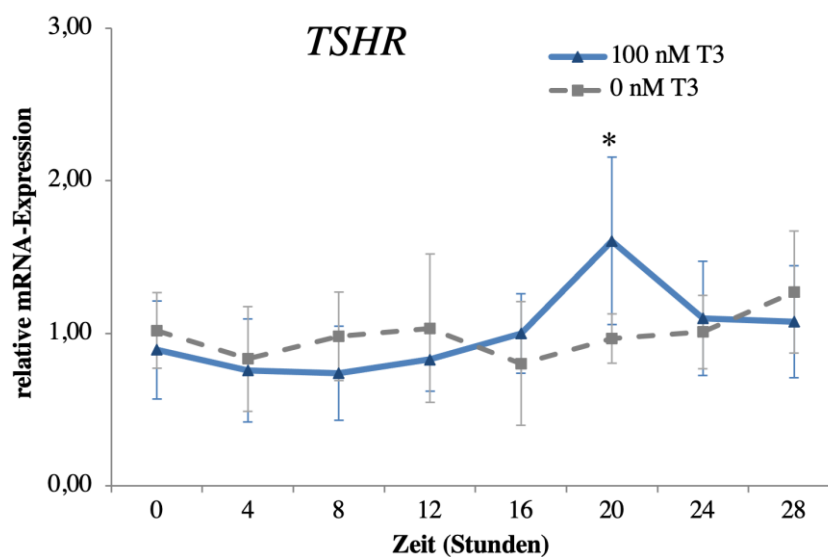


Abbildung 13: Relative mRNA-Expression des TSH-Rezeptors bei ADHS-Patient:innen nach Inkubation mit 0 nM und 100 nM T3, n=12. \* $p < 0,05$

Die Expression des TSH-Rezeptors bei Proband:innen mit der Diagnose ADHS wurde in der Arbeitsgruppe mit der Expression des Rezeptors bei Proband:innen ohne neuropsychiatrische Diagnose verglichen (parallel durchgeführte Forschungsarbeit). Die Inkubation der Fibroblasten mit T3 führte in HDF-Kulturen von Proband:innen mit einer ADHS-Diagnose und Proband:innen ohne neuropsychiatrische Erkrankung zu einem Expressionspeak. Bei den Proband:innen ohne neuropsychiatrische Diagnose ließ sich ein Peak 4 Stunden nach Synchronisation erkennen (siehe Abbildung 15 im Anhang). Bei den Proband:innen mit ADHS-Diagnose zeigte sich eine erhöhte Expression 16 Stunden später (siehe Abbildung 13). Zwischen HDF-Kulturen von Proband:innen mit einer ADHS-Diagnose und Proband:innen ohne neuropsychiatrische Erkrankung lässt sich somit eine Phasenverschiebung der TSH-Rezeptorexpression erkennen.

## 4. Diskussion

### 4.1. Fluvoxamin

Diese Studie untersuchte die Wirkung von Fluvoxamin auf die zirkadiane Genexpression im Fibroblastenmodell. Die Ergebnisse zeigen, dass der selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Fluvoxamin zu einer Veränderung des zirkadianen Rhythmus in humanen dermalen Fibroblasten von Studienteilnehmer:innen ohne neuropsychiatrische Erkrankung führt. Die Inkubation der Fibroblasten mit 5  $\mu$ M Fluvoxamin sorgte für eine signifikant veränderte Genexpression von *Cry1* und den *Per*-Genen sowie einen Verlust der Rhythmicität von *Clock* im Vergleich zu den unbehandelten Kulturen (siehe Abbildung 10).

Es zeigten sich mehrere Veränderungen in der rhythmischen Expression des *Cry1*-Gens. Die Kulturen mit Fluvoxamin wiesen 4 Stunden nach der Dexamethason-Synchronisation eine signifikant geringere Expression von *Cry1* auf als die Kulturen ohne Fluvoxamin. Zum Zeitpunkt 20 (20 Stunden nach Synchronisation) ist die Expression von *Cry1* in den Kulturen mit Fluvoxamin signifikant erhöht gegenüber denen ohne Fluvoxamin. In der Studie von Rozenblit-Susan et al. (2016), welche den Einfluss von Fluvoxamin an Mäusen untersuchte, wurden ebenfalls Veränderungen in Bezug auf die zirkadiane Genexpression in peripheren Geweben sichtbar. Die tägliche Verabreichung von Fluvoxamin (9 mg/kg/Tag) über 3 Wochen sorgte für eine erhöhte Amplitude der Expression von *Cry1* in der Leber und dem weißen Fettgewebe der Mäuse (Rozenblit-Susan et al., 2016). Unsere Ergebnisse zeigten die Tendenz einer abgeflachten Amplitude von *Cry1* sowie eine Phasenverschiebung um 4 Stunden durch den Einfluss von Fluvoxamin. Die Arbeit von Rozenblit-Susan et al. (2016) konnte darüber hinaus eine erhöhte Genexpression von *Bmal1* nach Fluvoxamin-Verabreichung feststellen. Wir konnten keine signifikanten Veränderungen in der Expression von *Bmal1* feststellen, es lässt sich jedoch die Tendenz einer Phasenverschiebung um 4 Stunden in den Kulturen mit Fluvoxamin erkennen (ähnlich dem Effekt von *Cry1*). Für *Per1* und *Per2* sahen wir zum Zeitpunkt 4 und für *Per3* zum Zeitpunkt 0 eine erhöhte Expression in den Kulturen mit Fluvoxamin. Dieser Effekt der Amplitudenzunahme ließ sich für *Per1* in der Studie von Rozenblit-Susan et al. (2016) in den Hepatozyten finden. Im Muskel- und Fettgewebe wiederum zeigte sich bei den Mäusen nach Fluvoxamin-Verabreichung eine Abnahme der Expression von *Per1*. In Fibroblasten von Ratten sorgte Fluvoxamin für eine Verkürzung der Periode von *Per1*-Rhythmen (Nomura et al., 2008). Diesen Effekt konnten wir in humanen dermalen Fibroblasten nicht beobachten. Wir stellten für *Clock* einen Verlust der Rhythmicität durch den Einfluss von Fluvoxamin fest. In den peripheren Geweben der Mäuse sorgte die

Fluvoxamin-Verabreichung hingegen für eine erhöhte Genexpression im Leber- und Fettgewebe und für eine verminderte Genexpression im Muskelgewebe. Eine Aufhebung des zirkadianen Rhythmus bewirkte Fluvoxamin im Mausmodell nicht (Rozenblit-Susan et al., 2016).

Interessant ist, dass sich signifikante Expressionsveränderungen durch Fluvoxamin nur auf der negativen Seite der Rückkopplungsschleife zeigen. Die Expressionserhöhung der *Per*-Gene als transkriptionshemmender Teil der Rückkopplungsschleife könnte ursächlich sein für die Unterdrückung des *Clock*-Rhythmus sowie den verzögerten Expressionspeak von *Bmal1*.

Einige Quellen berichten über klinische Belege, welche auf eine Veränderung der zirkadianen Rhythmik durch die therapeutische Verabreichung von Fluvoxamin hindeuten. Rota et al. (2005) konnten in ihrer Studie über den Einfluss von Fluvoxamin auf die Hypothalamus-Hypophysen-Achse eine Tendenz zur Korrektur der zirkadianen Anomalie der Cortisol-Sekretion bei depressiven Patient:innen feststellen. Allerdings waren die Ergebnisse nicht statistisch signifikant (Rota et al., 2005). Hermesh et al. (2001) beschrieben 10 Fälle, bei denen Patient:innen mit Zwangsstörungen unter der Therapie mit Fluvoxamin eine neu aufgetretene zirkadiane Rhythmusstörung entwickelten. Bei den Patient:innen konnte eine Rhythmusverschiebung der Schlaf- und Wachzeiten von 2,5 bis 4 Stunden beobachtet werden. Man spricht dabei von einem verzögerten Schlafphasensyndrom (DSPS). Durch das Absetzen von Fluvoxamin, oder eine erhebliche Dosisreduktion, konnte das DSPS wieder normalisiert werden. Bei erneuter Fluvoxamin-Verabreichung konnte ein erneutes Auftreten des DSPS beobachtet werden (Hermesh et al., 2001). Dieser Effekt stimmt mit der von uns im Fibroblastenmodell beobachteten Phasenverschiebung der zirkadianen Genexpression (*Bmal1*, *Cry1*) um etwa 4 Stunden überein. Hermesh et al. (2001) vermuten einen Zusammenhang dieser Wirkung mit dem Einfluss von Fluvoxamin auf den Melatonin-Serumspiegel. Demisch et al. (1987) stellten einen Anstieg der morgendlichen Melatonin-Serumspiegel bei Proband:innen fest, welche im Rahmen der Studie Fluvoxamin einnahmen. Weitere Studien bestätigten, dass Fluvoxamin für eine Erhöhung des Melatoninspiegels sorgt. Die Ursache wird dabei in der Hemmung von CYP1A2 und CYP2C19 gesehen, welche an der Metabolisierung von Melatonin beteiligt ist (Härtter et al., 2000; Härtter et al., 2001).

Melatonin nimmt eine wichtige Rolle in der Regulation des Schlafes ein und ist in der Lage, die zirkadiane Genexpression zu beeinflussen (Zisapel, 2018). Somit ist die Veränderung des

Melatoninspiegels durch Fluvoxamin eine denkbare Ursache für dessen Einfluss auf den zirkadianen Rhythmus. Unsere Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass die durch Fluvoxamin hervorgerufenen Effekte nicht nur auf die Änderung des Melatoninspiegels zurückzuführen sind, sondern auch auf den Einfluss von Fluvoxamin auf die zirkadianen Gene. Im humanen dermalen Fibroblastenmodell konnten wir eine durch Fluvoxamin verursachte Rhythmusverschiebung feststellen.

Andere Studien zeigen ebenfalls einen Einfluss der Medikation auf die zirkadiane Genexpression im Fibroblastenmodell. Remdesivir, ein Medikament, welches zur Covid-19 Behandlung eingesetzt wird, zeigte Veränderungen in der Expression zirkadianer Gene, die in einer verstärkten Abendpräferenz resultieren könnten (Faltraco et al., 2021). Aufgrund unserer Ergebnisse, welche auf eine Beeinflussung des zirkadianen Rhythmus durch Fluvoxamin hinweisen, empfehlen wir die Berücksichtigung einer solchen Veränderung als mögliche Nebenwirkung bei der Verschreibung von Fluvoxamin. Dabei sollte vor allem auf Hinweise für ein DSPS geachtet werden. Symptome wie Tagesmüdigkeit, aber auch Schlaflosigkeit sollten dabei nicht zwangsläufig als Symptom der mit Fluvoxamin behandelten Erkrankung gesehen, sondern auch als mögliche Nebenwirkung in Betracht gezogen werden (Crowley et al., 2007; Neuraxpharm®, 2013). Der Einfluss von Fluvoxamin auf die zirkadiane Genexpression kann jedoch auch positive Effekte bei (depressiven) Patient:innen mit verschobenem zirkadianen Rhythmus zum Zeitpunkt des Therapiebeginns mit sich bringen (Rota et al., 2005).

#### **4.1.1. Einfluss des Chronotypen**

Neben dem generellen Einfluss von Fluvoxamin auf die zirkadiane Genexpression wurden auch die Auswirkungen auf verschiedene Chronotypen untersucht. In dem von uns untersuchten Probandenkollektiv befanden sich 7 Teilnehmer:innen mit neutralem Chronotyp und 5 mit einer Morgenpräferenz (siehe Tabelle 6).

In den mit Fluvoxamin inkubierten Kulturen sehen wir die Tendenz einer Phasenverschiebung von *Bmal1* und *Cry1* sowie eine abgeflachte Amplitude von *Cry1* (siehe Abbildung 11). Diese Tendenz bilden beide Chronotypen gleichermaßen ab. Auch die Tendenz eines Genexpressionspeaks von *Per1* und *Per2* zum Zeitpunkt 4 ist für beide Chronotypen sichtbar. Bei der Expression von *Per3* fällt ein Anstieg bei den Proband:innen mit neutralen Chronotyp im Vergleich zu Proband:innen mit Morgenpräferenz zum Zeitpunkt 0 durch den Einfluss von Fluvoxamin auf.

Bei allen untersuchten zirkadianen Genen zeigte sich die Tendenz einer höheren Expression der Gene bei Proband:innen mit neutralem Chronotyp im Vergleich zu Proband:innen mit einer Morgenpräferenz. Dieser Effekt war signifikant für die Gene *Bmall*, *Cry1* und *Per3*. Der Expressionsunterschied kann dabei nicht auf Geschlecht oder Alter der Proband:innen zurückgeführt werden, da diese Merkmale in beiden Gruppen gleichmäßig verteilt waren. Soweit uns bekannt ist, wurde diese Beobachtung bisher nicht in der Literatur beschrieben. Interessant wäre eine Untersuchung dieses Phänomens mit einer größeren Stichprobe und unter Einbeziehung von Proband:innen mit abendlichem Chronotyp.

## 4.2. Triiodthyronin

Triiodthyronin (T3) erzeugte in den humanen dermalen Fibroblasten, welche von Proband:innen mit der Diagnose ADHS gewonnen wurden, eine veränderte zirkadiane Genexpression in allen untersuchten zirkadianen Genen (*Clock*, *Bmall*, *Cry1*, *Per1-3*). Durch die Inkubation der Fibroblastenkulturen mit 100 nM T3 zeigte sich für *Clock* eine verringerte Expression 12 Stunden nach Synchronisation. *Per1* wies eine Phasenverschiebung von etwa 8 Stunden sowie eine Verkürzung des Expressionsplateaus durch den Einfluss von T3 auf. Bei den Genen *Bmall*, *Cry1*, *Per2* und *Per3* sorgte T3 für eine Phasenverschiebung um 12 - 16 Stunden. Die T3-Inkubation der Fibroblasten von Patient:innen mit einer ADHS-Diagnose resultierte in einer Verschiebung des zirkadianen Rhythmus, wobei die Expressionspeaks der untersuchten zirkadianen Gene zu einem späteren Zeitpunkt nach Synchronisation auftraten (siehe Abbildung 12).

Neben dem Einfluss von T3 auf Patient:innen mit einer ADHS-Diagnose, wurde parallel in der Arbeitsgruppe auch die Wirkung von T3 auf Proband:innen ohne neuropsychiatrische Diagnose untersucht. Dabei zeigten sich nur geringe Abweichungen der zirkadianen Genexpression durch den Einfluss von T3 (siehe Abbildung 14 im Anhang). Signifikant waren die Expressionen von *Bmall* (ZP 0:  $p = 0,031$ ), *Per1* (ZP 0:  $p = 0,039$ ; ZP 20:  $p = 0,002$ ) und *Per3* (ZP 4:  $p = 0,010$ ). Die zirkadianen Gene *Clock*, *Cry1* und *Per2* wiesen in den Kulturen mit T3 eine nahezu identische Genexpression im Vergleich zu Kulturen ohne T3 auf. Die Tendenz einer Phasenverschiebung ließ sich nicht erkennen.

In vorherigen Studien an Ratten sorgte eine Hyperthyreose (Injektion von 0.75  $\mu\text{g}$  T3/100g) für eine erhöhte Expression von *Bmall* in der Hypophyse (Bargi-Souza et al., 2019). Bei der

Untersuchung der Kardiomyozyten hyperthyreoter Ratten fand man wiederum eine verringerte Amplitude von *Bmal1*. Zudem zeigte sich für *Bmal1* eine Phasenverschiebung (Peliciari-Garcia et al., 2018). Bei den, im parallelen Projekt untersuchten, dermalen Fibroblasten von Proband:innen ohne neuropsychiatrische Diagnose konnten diese Effekte durch T3 nicht beobachtet werden. Zum Zeitpunkt 0 zeigte *Bmal1* eine leicht erhöhte Expression durch den Einfluss von T3. Die Rhythmizität von *Per2* ging in der Hypophyse von hyperthyreoten Ratten verloren (Bargi-Souza et al., 2019). Im humanen dermalen Fibroblastenmodell konnte weder einen Rhythmizitätsverlust noch eine Veränderung der Expression von *Per2* durch T3-Inkubation festgestellt werden.

Im Gegensatz zu den Proband:innen mit der Diagnose ADHS, sorgte die Inkubation der Fibroblastenkulturen von Proband:innen ohne neuropsychiatrische Diagnose mit T3 kaum für eine Veränderung in der Expression zirkadianer Gene. Möglicherweise besitzen die Fibroblasten von Proband:innen ohne neuropsychiatrische Diagnose eine geringere Sensibilität gegenüber T3. Außerdem besteht die Möglichkeit einer unterschiedlich schnellen Anpassungsfähigkeit der Fibroblasten an die erhöhten T3-Spiegel. Unsere Ergebnisse lassen annehmen, dass ein erhöhter T3-Spiegel (sei es im Rahmen einer Hyperthyreose oder einer L-Thyroxin-Einnahme) bei Patient:innen ohne neuropsychiatrische Diagnose nicht zu einer Beeinflussung des zirkadianen Rhythmus führt. Die bei einem Überschuss an Schilddrüsenhormonen gelegentlich auftretenden Schlafstörungen scheinen dabei auf die hyperkinetische Wirkung von T3 sowie schilddrüsenhormonvermittelte Veränderungen von Stoffwechsel und Stimmung zurückzuführen zu sein (Green et al., 2021).

Albrecht et al. (2020) stellten fest, dass freies T3 positiv mit ADHS-Symptomen assoziiert ist. Eine andere Studie berichtet, dass das Risiko an ADHS zu erkranken bei Neugeborenen mit niedrigem Thyreotropin-Spiegel (TSH), und somit einer Hyperthyreose, erhöht ist gegenüber Neugeborenen mit normwertigem TSH (Villanger et al., 2020). Im Mausmodell wurde über den Zusammenhang von T3 und Symptomen wie Unaufmerksamkeit und Gedächtnisstörungen berichtet (Custodio et al., 2021). Die Neigung zu späteren Aufwach- und Schlafzeiten, im Sinne eines Abendtyps, konnte auch mit Unaufmerksamkeit und Hyperaktivität in Verbindung gebracht werden. Unter Patient:innen mit der Diagnose ADHS ist die Prävalenz des Abendtyps deutlich erhöht (Rybak et al., 2007; Caci et al., 2009; Bae et al., 2010). Auch das Auftreten eines verzögerten Schlafphasensyndroms (DSPS) lässt sich bei ADHS-Patient:innen häufiger beobachten (van Andel et al., 2021). Die Ausprägung des Abendtyps oder ein DSPS führt dabei

zu einer Verstärkung der ADHS-Symptomatik (Coogan & McGowan, 2017; van Andel et al., 2021). Im humanen dermalen Fibroblastenmodell von Proband:innen mit einer ADHS-Diagnose war nach Inkubation mit T3 eine Phasenverschiebung in den Expressionspeaks der zirkadianen Gene zu beobachten. Diese Phasenverschiebung kann zu einer Verstärkung der Abendpräferenz bzw. dem Auslösen eines DSPS führen. Hohe T3-Spiegel könnten demnach mit einer Verschlimmerung der Symptomatik bei ADHS-Patient:innen einhergehen.

Neben dem wichtigsten Zeitgeber, dem Licht, übt auch die Essenzeit einen Einfluss auf die zirkadiane Uhr aus (Panda, 2016). Somit besitzt nicht nur die zirkadiane Genexpression Einfluss auf die Stoffwechselrhythmen, sondern auch die Nahrungsaufnahme wirkt sich auf die zirkadiane Genexpression aus (Kessler & Pivovarova-Ramich, 2019). T3 sorgt in seiner stoffwechselsteigernden Funktion für einen Anstieg des Blutzuckerspiegels und somit für die Freisetzung von Insulin (Lang & Föller, 2019). Ein hoher T3-Spiegel setzt damit einen ähnlichen Impuls wie eine Nahrungsaufnahme. Im humanen dermalen Fibroblastenmodell von ADHS-Patient:innen war eine zirkadiane Phasenverschiebung durch die Inkubation mit T3 in nahezu allen untersuchten Genen (*Bmall*, *Cry1*, *Per1-3*) zu beobachten. Somit besitzt T3 in unserem Modell eine Zeitgeberfunktion, welche für eine Verstärkung der Abendpräferenz sorgt. Wir vermuten, dass T3 im Organismus für eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels sorgt, welche über die Glucose-Rezeptoren wahrgenommen wird und eine Anpassung der peripheren Uhren bewirkt und somit die zirkadiane Genexpression beeinflusst (Chaput & Tremblay, 2009).

Es konnte gezeigt werden, dass Melatonin, und somit der Zeitgeber Licht, in der Lage ist, den endokrinen Rhythmus der Schilddrüsenhormone zu beeinflussen (Mirunalini & Subramanian, 2005). Die Vermutung liegt nahe, dass feste Essenszeiten sich auf den T3-Spiegel auswirken können. Personen mit der Diagnose ADHS zeigen oft eine Abendpräferenz, was ein spätes Aufwachen und somit eine spätere Nahrungsaufnahme bedeutet. Das Auslassen von Mahlzeiten, vor allem des Frühstücks, ist charakteristisch für Personen mit abendlichem Chronotyp (van der Merwe et al., 2022). Der Zeitpunkt der Mahlzeiten könnte die zirkadiane Genexpression bei Personen mit einer ADHS-Diagnose beeinflussen. Ein Ausleben des Abendtyps (kein Frühstück, Mahlzeiten zu späten Tageszeiten) resultiert wahrscheinlich in einer Verstärkung der Abendpräferenz und führt bei ADHS-Patient:innen zur Verschlimmerung der Symptomatik. Wir vermuten, dass eine Verschiebung der Abendpräferenz durch optimale Essenszeiten in Richtung Morgen- bzw. Neutraltyp zu einer Verbesserung der ADHS-Symptomatik führen kann. Zur Überprüfung unserer Vermutung sind

weitere Studien zur Untersuchung des Einflusses von Glucose und Insulin auf die zirkadiane Genexpression von Interesse.

### **4.3. Limitierende Studienfaktoren**

Als Modellsysteme in der Forschung an neuropsychiatrischen Erkrankungen eignen sich unter anderem Mäuse und Ratten. So existiert beispielsweise das sogenannte „Wig rat model“, welches zur Erforschung von ADHS eingesetzt wird (Kamimura et al., 2001; Russell et al., 2005). In Bezug auf die Expression zirkadianer Gene bestehen allerdings Unterschiede zwischen Nagetieren und Menschen. Nagetiere als Modellorganismen in der psychiatrischen Forschung weisen den Nachteil der Nachtaktivität auf. Zudem äußern zirkadiane Gen-Knockouts bei Mäusen ihren Phänotyp meist in einem monogenen mendelschen Vererbungsmuster. Eine derartige „Gen-Löschung“ ist beim Menschen bisher nicht beobachtet worden (Palm et al., 2023).

*In vitro* Modelle mit vom Menschen stammenden dermalen Fibroblasten haben die Möglichkeit eröffnet, Unterschiede in der Expression von Genen zu untersuchen, die mit der autonomen Uhr der Zelle zwischen Personen ohne neuropsychiatrische Störung und Personen mit neuropsychiatrischer Störung verbunden sind (Hida et al., 2017; Nagoshi et al., 2004). Das Fibroblastenmodell wird außerdem bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer Erkrankung genutzt, um Amyloid-Vorläuferprotein oder hyperphosphoryliertes TAU zu untersuchen (Shahpasand et al., 2012).

Das Modellsystem der humanen dermalen Fibroblasten eignet sich zur Untersuchung der zirkadianen Genexpression, da individuelle Spendereigenschaften bestehen bleiben und in der Genexpression abgebildet werden können (Coogan et al., 2019). Kultivierte Fibroblasten weisen eine molekulare Ähnlichkeit zu Zellen des zentralen Nervensystems auf. Sie können sich ohne genetische Manipulation über mehr als 20 Passagen hinweg vermehren und besitzen einen zellautonomen, selbsterhaltenden zirkadianen Rhythmus (Nagoshi et al., 2004; Kálmán et al., 2016). Zudem sind Fibroblastenkulturen für *in vitro* Studien zur Wirkung pharmakologischer Substanzen geeignet (Hida et al., 2013; Kálmán et al., 2016). Die Gewinnung von Fibroblastenkulturen mittels Hautbiopsie ist einfach und vergleichsweise unproblematisch durchführbar. Die Fibroblastenkulturen können mittels gut etablierter Labormethoden (RNA-Isolation, cDNA-Synthese, qRT-PCR) untersucht werden (Faltraco et al., 2021; Palm et al., 2021).

Limitierend war die Sammlung und Aufarbeitung der Proben alle vier Stunden über einen Zeitraum von 28 Stunden. Wünschenswert wäre eine kontinuierliche Messung der Genexpressionen durch einen, in die Fibroblasten transformierten, lentiviralen Vektor, welcher ein Luciferase-Gen unter Kontrolle des zirkadianen Promotors (z.B. *Bmal1* Promotor) enthält. Ein nächster Schritt könnte auch die Generierung von Human-induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) aus dermalen Fibroblasten sowie die Differenzierung von iPSC zu gewünschten Zelltypen zur Modellbildung und Therapie neuropsychiatrischer Erkrankungen sein.

Anzumerken ist die teils größere Streuung (Standardabweichung) bei den Expressionsniveaus der zirkadianen Gene. Da sowohl die Gruppe der Proband:innen ohne neuropsychiatrische Erkrankungen als auch die Gruppe der Proband:innen mit einer ADHS-Diagnose verschiedene Ausprägungen an Chronotypen zeigen, ist anzunehmen, dass die Standardabweichung auf die unterschiedlichen Chronotypen in den beiden Gruppen zurückzuführen ist. Für weitere Studien ist es von Interesse, Faktoren wie beispielsweise Chronotyp, Geschlecht, Alter oder BMI in Analysen mit einem entsprechenden Stichprobenumfang (z.B. Proband:innen ohne neuropsychiatrische Erkrankung mit neutralem Chronotyp n=12 und morgendlichem Chronotyp n=12) zu berücksichtigen.

Es ist zu erwähnen, dass in dieser Studie keine speziellen kognitiven Tests durchgeführt wurden. Für weitere Untersuchungen wäre ein Zusammenhang zwischen zirkadianen Störungen und kognitiven Defiziten sowie der Wirkung von Medikamenten wünschenswert.

## 5. Zusammenfassung

Der zirkadiane Rhythmus sowie dessen Auswirkungen auf den Organismus sind Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Arbeiten. In den letzten Jahren konnten Assoziationen zwischen Störungen des zirkadianen Rhythmus und Krankheitsbildern erkannt werden, zu denen die Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung (ADHS) zählt. Ein Forschungsmodell zur Untersuchung der zirkadianen Genexpression stellt das humane dermale Fibroblastenmodell dar, mittels dessen auch der Einfluss verschiedener Substanzen getestet werden kann.

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses von Fluvoxamin und Triiodthyronin (T3) auf die zirkadiane Genexpression von humanen dermalen Fibroblasten. Dies erfolgte für Fluvoxamin an Fibroblasten von Proband:innen ohne neuropsychiatrische Erkrankung und für T3 an Fibroblasten von Patient:innen mit der Diagnose ADHS.

Humane dermale Fibroblasten stellen ein vorteilhaftes Modell zur Untersuchung des Einflusses von Substanzen auf die zirkadiane Genexpression dar. Die Fibroblasten wurden mittels Stanzbiopsie gewonnen, kultiviert und mit 5 µM Fluvoxamin bzw. 100 nM T3 inkubiert. Anschließend erfolgte die Synchronisation mit Dexamethason und die Probenentnahme alle vier Stunden über einen Zeitraum von 28 Stunden. Die Analyse mittels qRT-PCR erlaubte die Darstellung der zirkadianen Genexpression von *Clock*, *Bmal1*, *Cry1* und *Per1-3*.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die beiden untersuchten Substanzen auf die zirkadiane Genexpression auswirken. Fluvoxamin sorgte dabei für eine signifikant veränderte Expression von *Cry1* und *Per1-3* sowie einen Verlust der Rhythmicität von *Clock*. Es zeigte sich die Tendenz einer Phasenverschiebung von *Bmal1* und *Cry1* um 4 Stunden. Die Ergebnisse unterstützen die Beobachtungen von Hermesh et al. (2001), dass Fluvoxamin zu einem verzögerten Schlafphasensyndrom (DSPS) führen kann. Eine zirkadiane Rhythmusverschiebung sollte demnach als Nebenwirkung des selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmers Fluvoxamin in Betracht gezogen werden.

In den Fibroblasten von ADHS-Patient:innen führte die Inkubation mit T3 zu signifikanten Veränderungen in der Expression aller untersuchten zirkadianen Gene. Bei den Genen *Bmal1*, *Cry1* und *Per1-3* sorgte T3 für eine Phasenverschiebung um 8 bis 16 Stunden und resultierte somit in einer stärkeren Ausprägung der Abendpräferenz bzw. einem DSPS. Hohe T3-Spiegel könnten demnach zu einer Verstärkung der ADHS-Symptomatik führen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Ahmed, O. M., El-Gareib, A. W., El-bakry, A. M., Abd El-Tawab, S. M., & Ahmed, R. G. (2008). Thyroid hormones states and brain development interactions. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 26(2), 147–209. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2007.09.011>
- Albrecht, D., Ittermann, T., Thamm, M., Grabe, H.-J., Bahls, M., & Völzke, H. (2020). The association between thyroid function biomarkers and attention deficit hyperactivity disorder. *Scientific Reports*, 10(1), 18285. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75228-w>
- Amir, S., & Robinson, B. (2006). Thyroidectomy alters the daily pattern of expression of the clock protein, PER2, in the oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis and central nucleus of the amygdala in rats. *Neuroscience Letters*, 407(3), 254–257. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.08.057>
- Arnemann, J. (2019). DNA-/RNA-Konzentrationsbestimmung. In A. M. Gressner & T. Arndt (Hrsg.), *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (S. 719–719). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4\\_3464](https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_3464)
- Aschoff, J. (1960). Exogenous and Endogenous Components in Circadian Rhythms. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 25(0), 11–28. <https://doi.org/10.1101/SQB.1960.025.01.004>
- Astiz, M., Heyde, I., & Oster, H. (2019). Mechanisms of Communication in the Mammalian Circadian Timing System. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 343. <https://doi.org/10.3390/ijms20020343>
- Bae, S.-M., Park, J. E., Lee, Y. J., Cho, I. H., Kim, J.-H., Koh, S.-H., Kim, S. J., & Cho, S.-J. (2010). Gender difference in the association between adult attention deficit hyperactivity disorder symptoms and morningness–eveningness. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 64(6), 649–651. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1819.2010.02140.x>

- 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. *Molecular Psychiatry*, *17*(10), 988–995. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.149>
- Bargi-Souza, P., Peliciari-Garcia, R. A., & Nunes, M. T. (2019). Disruption of the Pituitary Circadian Clock Induced by Hypothyroidism and Hyperthyroidism: Consequences on Daily Pituitary Hormone Expression Profiles. *Thyroid*, *29*(4), 502–512. <https://doi.org/10.1089/thy.2018.0578>
- Berson, D. M., Dunn, F. A., & Takao, M. (2002). Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock. *Science*, *295*(5557), 1070–1073. <https://doi.org/10.1126/science.1067262>
- Bijlenga, D., van der Heijden, K. B., Breuk, M., van Someren, E. J. W., Lie, M. E. H., Boonstra, A. M., Swaab, H. J. T., & Kooij, J. J. S. (2013). Associations Between Sleep Characteristics, Seasonal Depressive Symptoms, Lifestyle, and ADHD Symptoms in Adults. *Journal of Attention Disorders*, *17*(3), 261–275. <https://doi.org/10.1177/1087054711428965>
- Bioulac, S., Sagaspe, P., Tron, E., Benard, A., Berthomier, C., Brandewinder, M., Philip, P., & Taillard, J. (2021). Does Homeostatic Sleep Pressure Buildup Explain Objective Excessive Daytime Sleepiness in Adults With ADHD? An Exploratory Study. *Frontiers in Psychiatry*, *12*, 586528. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.586528>
- 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. *Sleep*, *30*(4), 433–442. <https://doi.org/10.1093/sleep/30.4.433>
- Borgers, A. J., Koopman, K. E., Bisschop, P. H., Serlie, M. J., Swaab, D. F., Fliers, E., la Fleur, S. E., & Alkemade, A. (2014). Decreased serotonin transporter immunoreactivity in the human hypothalamic infundibular nucleus of overweight subjects. *Frontiers in Neuroscience*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00106>

- Bradley, P. B., & Hance, A. J. (1956). The effects of intraventricular injection of d-lysergic acid diethylamide (LSD 25) and 5-hydroxytryptamine (serotonin) on the electrical activity of the brain of the conscious cat. *The Journal of Physiology*, *132*(2), 50-51P.
- Brainard, J., Gobel, M., Scott, B., Koeppen, M., & Eckle, T. (2015). Health Implications of Disrupted Circadian Rhythms and the Potential for Daylight as Therapy. *Anesthesiology*, *122*(5), 1170–1175.  
<https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000596>
- Buhr, E. D., & Takahashi, J. S. (2013). Molecular Components of the Mammalian Circadian Clock. In A. Kramer & M. Merrow (Hrsg.), *Circadian Clocks* (Bd. 217, S. 3–27). Springer Berlin Heidelberg.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-642-25950-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-25950-0_1)
- Cabrera Lagunes, A., Díaz-Anzaldúa, A., Rojas Andrade, G., Peschard, V.-G., Arias Caballero, A., Gaspar-Barba, C. E., Yunes Jimenez, A., De la Peña Olvera, F. R., Cruz Fuentes, C. S., Feria-Aranda, M., Sosa Mora, L., Pérez Molina, A., Guizar Sanchez, D., & Palacios-Cruz, L. (2022). Association between CLOCK gene polymorphisms and ADHD in Mexican teenagers: A comprehensive assessment. *Psychiatry Research*, *317*, 114835.  
<https://doi.org/10.1016/j.psychres.2022.114835>
- Caci, H., Bouchez, J., & Baylé, F. J. (2009). Inattentive Symptoms of ADHD Are Related to Evening Orientation. *Journal of Attention Disorders*, *13*(1), 36–41.  
<https://doi.org/10.1177/1087054708320439>
- Chambers, T., Anney, R., Taylor, P. N., Teumer, A., Peeters, R. P., Medici, M., Caseras, X., & Rees, D. A. (2021). Effects of Thyroid Status on Regional Brain Volumes: A Diagnostic and Genetic Imaging Study in UK Biobank. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *106*(3), 688–696.  
<https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa903>
- Chaput, J.-P., & Tremblay, A. (2009). The glucostatic theory of appetite control and the risk of obesity and diabetes. *International Journal of Obesity (2005)*, *33*(1), 46–53.  
<https://doi.org/10.1038/ijo.2008.221>

- Cheng, W.-J., Liu, C.-S., Hu, K.-C., Cheng, Y.-F., Karhula, K., & Härmä, M. (2021). Night shift work and the risk of metabolic syndrome: Findings from an 8-year hospital cohort. *PLOS ONE*, *16*(12), e0261349. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261349>
- Cianfarani, F., Baldini, E., Cavalli, A., Marchioni, E., Lembo, L., Teson, M., Persechino, S., Zambruno, G., Ulisse, S., Odorisio, T., & D'Armiento, M. (2010). TSH Receptor and Thyroid-Specific Gene Expression in Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, *130*(1), 93–101. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.180>
- Coogan, A. N., & McGowan, N. M. (2017). A systematic review of circadian function, chronotype and chronotherapy in attention deficit hyperactivity disorder. *ADHD Attention Deficit and Hyperactivity Disorders*, *9*(3), 129–147. <https://doi.org/10.1007/s12402-016-0214-5>
- Coogan, A. N., Schenk, M., Palm, D., Uzoni, A., Grube, J., Tsang, A. H., Kolbe, I., McGowan, N. M., Wandschneider, R., Colla, M., Oster, H., Thome, J., & Faltraco, F. (2019). Impact of adult attention deficit hyperactivity disorder and medication status on sleep/wake behavior and molecular circadian rhythms. *Neuropsychopharmacology*, *44*(7), 1198–1206. <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0327-6>
- Corkum, P., Tannock, R., & Moldofsky, H. (1998). Sleep Disturbances in Children With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, *37*(6), 637–646. <https://doi.org/10.1097/00004583-199806000-00014>
- Crowley, S. J., Acebo, C., & Carskadon, M. A. (2007). Sleep, circadian rhythms, and delayed phase in adolescence. *Sleep Medicine*, *8*(6), 602–612. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2006.12.002>
- Custodio, R. J. P., Kim, M., Sayson, L. V., Lee, H. J., Ortiz, D. M., Kim, B.-N., Kim, H. J., & Cheong, J. H. (2021). Low striatal T3 is implicated in inattention and memory impairment in an ADHD mouse model overexpressing thyroid hormone-responsive protein. *Communications Biology*, *4*(1), 1101. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02633-w>

- Czeisler, C. A., Duffy, J. F., Shanahan, T. L., Brown, E. N., Mitchell, J. F., Rimmer, D. W., Ronda, J. M., Silva, E. J., Allan, J. S., Emens, J. S., Dijk, D.-J., & Kronauer, R. E. (1999). Stability, Precision, and Near-24-Hour Period of the Human Circadian Pacemaker. *Science*, 284(5423), 2177–2181. <https://doi.org/10.1126/science.284.5423.2177>
- Davis, S., Mirick, D. K., & Stevens, R. G. (2001). Night Shift Work, Light at Night, and Risk of Breast Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 93(20), 1557–1562. <https://doi.org/10.1093/jnci/93.20.1557>
- Davy, J. (1845). XIV. On the temperature of man. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 135, 319–333. <https://doi.org/10.1098/rstl.1845.0014>
- Demisch, K., Demisch, L., Nickelsen, T., & Rieth, R. (1987). The influence of acute and subchronic administration of various antidepressants on early morning melatonin plasma levels in healthy subjects: Increases following fluvoxamine. *Journal of Neural Transmission*, 68(3–4), 257–270. <https://doi.org/10.1007/BF02098502>
- Dibner, C., Sadowski, S. M., Triponez, F., & Philippe, J. (2017). The search for preoperative biomarkers for thyroid carcinoma: Application of the thyroid circadian clock properties. *Biomarkers in Medicine*, 11(3), 285–293. <https://doi.org/10.2217/bmm-2016-0316>
- Dijk, D.-J., & Landolt, H.-P. (2019). Sleep Physiology, Circadian Rhythms, Waking Performance and the Development of Sleep-Wake Therapeutics. In H.-P. Landolt & D.-J. Dijk (Hrsg.), *Sleep-Wake Neurobiology and Pharmacology* (Bd. 253, S. 441–481). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/164\\_2019\\_243](https://doi.org/10.1007/164_2019_243)
- Dücker, A., Reis, O., Wagner, H., Wunsch, K., Häbeler, F., Kölch, M., Astiz, M., Thome, J., Berger, C., & Oster, H. (2022). Clock Genes Profiles as Diagnostic Tool in (Childhood) ADHD—A Pilot Study. *Brain Sciences*, 12(9), 1198. <https://doi.org/10.3390/brainsci12091198>

- Fahrenkrug, J., Georg, B., Hannibal, J., & Jørgensen, H. L. (2017). Hypophysectomy abolishes rhythms in rat thyroid hormones but not in the thyroid clock. *Journal of Endocrinology*, 233(3), 209–216.  
<https://doi.org/10.1530/JOE-17-0111>
- Faltraco, F., Palm, D., Coogan, A., Uzoni, A., Duwe, I., Simon, F., Tucha, O., & Thome, J. (2021a). Remdesivir shifts circadian rhythmicity to eveningness; similar to the most prevalent chronotype in ADHD. *Journal of Neural Transmission*, 128(7), 1159–1168.  
<https://doi.org/10.1007/s00702-021-02375-3>
- Faltraco, F., Palm, D., Coogan, A., Uzoni, A., Duwe, I., Simon, F., Tucha, O., & Thome, J. (2021b). Remdesivir shifts circadian rhythmicity to eveningness; similar to the most prevalent chronotype in ADHD. *Journal of Neural Transmission*, 128(7), 1159–1168.  
<https://doi.org/10.1007/s00702-021-02375-3>
- Faltraco, F., Palm, D., Uzoni, A., Borchert, L., Simon, F., Tucha, O., & Thome, J. (2021). Dopamine adjusts the circadian gene expression of Per2 and Per3 in human dermal fibroblasts from ADHD patients. *Journal of Neural Transmission*, 128(7), 1135–1145.  
<https://doi.org/10.1007/s00702-021-02374-4>
- Faltraco, F., Palm, D., Uzoni, A., Simon, F., Tucha, O., & Thome, J. (2021). Atomoxetine and circadian gene expression in human dermal fibroblasts from study participants with a diagnosis of attention-deficit hyperactivity disorder. *Journal of Neural Transmission*, 128(7), 1121–1133.  
<https://doi.org/10.1007/s00702-021-02373-5>
- Faraone, S. V., Biederman, J., & Mick, E. (2006). The age-dependent decline of attention deficit hyperactivity disorder: A meta-analysis of follow-up studies. *Psychological Medicine*, 36(2), 159–165.  
<https://doi.org/10.1017/S003329170500471X>

- Fayyad, J., Sampson, N. A., Hwang, I., Adamowski, T., Aguilar-Gaxiola, S., Al-Hamzawi, A., Andrade, L. H. S. G., Borges, G., de Girolamo, G., Florescu, S., Gureje, O., Haro, J. M., Hu, C., Karam, E. G., Lee, S., Navarro-Mateu, F., O'Neill, S., Pennell, B.-E., Piazza, M., ... Kessler, R. C. (2017). The descriptive epidemiology of DSM-IV Adult ADHD in the World Health Organization World Mental Health Surveys. *ADHD Attention Deficit and Hyperactivity Disorders*, 9(1), 47–65.  
<https://doi.org/10.1007/s12402-016-0208-3>
- Fietze, I., & Penzel, T. (2019). Schlafstörungen – Prävalenz, Bedeutung und Implikationen für die Prävention und Gesundheitsförderung. In M. Tiemann & M. Mohokum (Hrsg.), *Prävention und Gesundheitsförderung* (S. 1–8). Springer Berlin Heidelberg.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-662-55793-8\\_63-1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-55793-8_63-1)
- Ford, D. E., & Kamerow, D. B. (1989). Epidemiologic study of sleep disturbances and psychiatric disorders. An opportunity for prevention? *JAMA*, 262(11), 1479–1484.  
<https://doi.org/10.1001/jama.262.11.1479>
- Fu, L., & Lee, C. C. (2003). The circadian clock: Pacemaker and tumour suppressor. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 350–361. <https://doi.org/10.1038/nrc1072>
- Gahr, M., Connemann, B. J., Zeiss, R., & Fröhlich, A. (2018). Schlafstörungen und Beeinträchtigungen des Schlafs als Nebenwirkungen von Psychopharmaka: Eine Bewertung der Daten aus Fachinformationen. *Fortschritte der Neurologie · Psychiatrie*, 86(07), 410–421. <https://doi.org/10.1055/s-0043-119800>
- Glass, J. D., Grossman, G. H., Farnbauch, L., & DiNardo, L. (2003). Midbrain Raphe Modulation of Nonphotic Circadian Clock Resetting and 5-HT Release in the Mammalian Suprachiasmatic Nucleus. *The Journal of Neuroscience*, 23(20), 7451–7460. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-20-07451.2003>
- Golan, N., Shahar, E., Ravid, S., & Pillar, G. (2004). Sleep Disorders and Daytime Sleepiness in Children with Attention-Deficit/ Hyperactive Disorder. *Sleep*, 27(2), 261–266.  
<https://doi.org/10.1093/sleep/27.2.261>

- Green, M. E., Bernet, V., & Cheung, J. (2021). Thyroid Dysfunction and Sleep Disorders. *Frontiers in Endocrinology*, *12*, 725829. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.725829>
- Haney, E. M., Calarge, C., & Bliziotis, M. M. (2013). Clinical Implications of Serotonin Regulation of Bone Mass. In *Translational Endocrinology of Bone* (S. 189–198). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415784-2.00016-6>
- Härtter, S., Grözinger, M., Weigmann, H., Röschke, J., & Hiemke, C. (2000). Increased bioavailability of oral melatonin after fluvoxamine coadministration. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *67*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1067/mcp.2000.104071>
- Härtter, S., Wang, X., Weigmann, H., Friedberg, T., Arand, M., Oesch, F., & Hiemke, C. (2001). Differential effects of fluvoxamine and other antidepressants on the biotransformation of melatonin. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, *21*(2), 167–174. <https://doi.org/10.1097/00004714-200104000-00008>
- Hauser, P., Zametkin, A. J., Martinez, P., Vitiello, B., Matochik, J. A., Mixson, J. A., & Weintraub, B. D. (1993). Attention Deficit-Hyperactivity Disorder in People with Generalized Resistance to Thyroid Hormone. *New England Journal of Medicine*, *328*(14), 997–1001. <https://doi.org/10.1056/NEJM199304083281403>
- Hermesh, H., Lemberg, H., Abadi, J., & Dagan, Y. (2001). Circadian Rhythm Sleep Disorders as a Possible Side Effect of Fluvoxamine. *CNS Spectrums*, *6*(6), 511–513. <https://doi.org/10.1017/S1092852900008051>
- Heymer A, Jany C, Kaufmann M. (2009). *Isolation of keratinocytes and fibroblasts from human foreskin by one-step enzyme incubation using liberase research grade products*. *2*, 12–14.
- Hida, A., Kitamura, S., Ohsawa, Y., Enomoto, M., Katayose, Y., Motomura, Y., Moriguchi, Y., Nozaki, K., Watanabe, M., Aritake, S., Higuchi, S., Kato, M., Kamei, Y., Yamazaki, S., Goto, Y., Ikeda, M., & Mishima, K. (2013). In vitro circadian period is associated with circadian/sleep preference. *Scientific Reports*, *3*(1), 2074. <https://doi.org/10.1038/srep02074>

- Hida, A., Ohsawa, Y., Kitamura, S., Nakazaki, K., Ayabe, N., Motomura, Y., Matsui, K., Kobayashi, M., Usui, A., Inoue, Y., Kusanagi, H., Kamei, Y., & Mishima, K. (2017). Evaluation of circadian phenotypes utilizing fibroblasts from patients with circadian rhythm sleep disorders. *Translational Psychiatry*, 7(4), e1106–e1106. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.75>
- Horne, J. A., & Ostberg, O. (1976). A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *International Journal of Chronobiology*, 4(2), 97–110.
- Hvolby, A. (2015). Associations of sleep disturbance with ADHD: Implications for treatment. *ADHD Attention Deficit and Hyperactivity Disorders*, 7(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s12402-014-0151-0>
- Kálmán, S., Garbett, K. A., Janka, Z., & Mirnics, K. (2016). Human dermal fibroblasts in psychiatry research. *Neuroscience*, 320, 105–121. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.01.067>
- Kalsbeek, A., & Fliers, E. (2013). Daily Regulation of Hormone Profiles. In A. Kramer & M. Merrow (Hrsg.), *Circadian Clocks* (Bd. 217, S. 185–226). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-25950-0\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-642-25950-0_8)
- Kamimura, E., Ueno, Y., Tanaka, S., Sawa, H., Yoshioka, M., Ueno, K. I., Inoue, T., Li, X., Koyama, T., Ishikawa, R., & Nagashima, K. (2001). New rat model for attention deficit hyperactive disorder (ADHD). *Comparative Medicine*, 51(3), 245–251.
- Kessler, K., & Pivovarov-Ramich, O. (2019). Meal Timing, Aging, and Metabolic Health. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 1911. <https://doi.org/10.3390/ijms20081911>
- Kissling, C., Retz, W., Wiemann, S., Coogan, A. N., Clement, R. M., Hünnerkopf, R., Conner, A. C., Freitag, C. M., Rösler, M., & Thome, J. (2008). A polymorphism at the 3'-untranslated region of theCLOCK gene is associated with adult attention-deficit hyperactivity disorder. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric*

*Genetics*, 147B(3), 333–338. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30602>

Kleinau, G., & Krause, G. (2009). Thyrotropin and Homologous Glycoprotein Hormone Receptors: Structural and Functional Aspects of Extracellular Signaling Mechanisms. *Endocrine Reviews*, 30(2), 133–151. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0044>

Klinke, R., Pape, H.-C., Kurtz, A., Silbernagl, S., Baumann, R., Brenner, B., Gay, R., & Rothenburger, A. (Hrsg.). (2010). *Physiologie* (6., vollst. überarb. Aufl). Thieme.  
Konofal, E., Lecendreux, M., & Cortese, S. (2010). Sleep and ADHD. *Sleep Medicine*, 11(7), 652–658. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2010.02.012>

Kooij, J. J. S., Bijlenga, D., Salerno, L., Jaeschke, R., Bitter, I., Balázs, J., Thome, J., Dom, G., Kasper, S., Nunes Filipe, C., Stes, S., Mohr, P., Leppämäki, S., Casas, M., Bobes, J., Mccarthy, J. M., Richarte, V., Kjems Philipsen, A., Pehlivanidis, A., ... Asherson, P. (2019). Updated European Consensus Statement on diagnosis and treatment of adult ADHD. *European Psychiatry*, 56(1), 14–34. <https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2018.11.001>

Kriegebaum, C., Gutknecht, L., Schmitt, A., Lesch, K.-P., & Reif, A. (2010). Serotonin Kompakt – Teil 1. *Fortschritte der Neurologie · Psychiatrie*, 78(06), 319–331. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1245240>

Lack. (2009). Chronotype differences in circadian rhythms of temperature, melatonin, and sleepiness as measured in a modified constant routine protocol. *Nature and Science of Sleep*, 1. <https://doi.org/10.2147/NSS.S6234>

Lang, F., & Föller, M. (2019). Schilddrüsenhormone. In R. Brandes, F. Lang, & R. F. Schmidt (Hrsg.), *Physiologie des Menschen* (S. 932–936). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-56468-4\\_75](https://doi.org/10.1007/978-3-662-56468-4_75)

Lapierre, Y. D., Browne, M., Horn, E., Oyewumi, L. K., Sarantidis, D., Roberts, N., Badoe, K., & Tessier, P. (1987). Treatment of major affective disorder with fluvoxamine. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 48(2), 65–68.

- Lavebratt, C., Sjöholm, L. K., Partonen, T., Schalling, M., & Forsell, Y. (2010). PER2 variantion is associated with depression vulnerability. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, *153B*(2), 570–581. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.31021>
- Lavebratt, C., Sjöholm, L. K., Soronen, P., Paunio, T., Vawter, M. P., Bunney, W. E., Adolfsson, R., Forsell, Y., Wu, J. C., Kelsoe, J. R., Partonen, T., & Schalling, M. (2010). CRY2 Is Associated with Depression. *PLoS ONE*, *5*(2), e9407. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009407>
- Lenze, E. J., Mattar, C., Zorumski, C. F., Stevens, A., Schweiger, J., Nicol, G. E., Miller, J. P., Yang, L., Yingling, M., Avidan, M. S., & Reiersen, A. M. (2020). Fluvoxamine vs Placebo and Clinical Deterioration in Outpatients With Symptomatic COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, *324*(22), 2292. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.22760>
- Lerman, J. (1954). THE CONTRIBUTION OF TRIIODOTHYRONINE TO THYROID PHYSIOLOGY. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *14*(6), 690–693. <https://doi.org/10.1210/jcem-14-6-690>
- Lesch, K.-P., & Mössner, R. (1998). Genetically driven variation in serotonin uptake: Is there a link to affective spectrum, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders? *Biological Psychiatry*, *44*(3), 179–192. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(98\)00121-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(98)00121-8)
- Li, Y., Shao, L., Mou, Y., Zhang, Y., & Ping, Y. (2021). Sleep, circadian rhythm and gut microbiota: Alterations in Alzheimer’s disease and their potential links in the pathogenesis. *Gut Microbes*, *13*(1), 1957407. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1957407>
- Linkowski, P., Mendlewicz, J., Leclercq, R., Brasseur, M., Hubain, P., Golstein, J., Copinschi, G., & Cauter, E. V. (1985). The 24-Hour Profile of Adrenocorticotropin and Cortisol in Major Depressive Illness\*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *61*(3), 429–438. <https://doi.org/10.1210/jcem-61-3-429>

- Lubkin, V., Beizai, P., & Sadun, A. A. (2002). The Eye as Metronome of the Body. *Survey of Ophthalmology*, 47(1), 17–26. [https://doi.org/10.1016/S0039-6257\(01\)00282-X](https://doi.org/10.1016/S0039-6257(01)00282-X)
- Lucki, I. (1998). The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biological Psychiatry*, 44(3), 151–162. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(98\)00139-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(98)00139-5)
- Ma, M. A., & Morrison, E. H. (2022). Neuroanatomy, Nucleus Suprachiasmatic. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK546664/>
- Malek, Z. S., Sage, D., Pévet, P., & Raison, S. (2007). Daily Rhythm of Tryptophan Hydroxylase-2 Messenger Ribonucleic Acid within Raphe Neurons Is Induced by Corticoid Daily Surge and Modulated by Enhanced Locomotor Activity. *Endocrinology*, 148(11), 5165–5172. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0526>
- Menet, J. S., Rodriguez, J., Abruzzi, K. C., & Rosbash, M. (2012). Nascent-Seq reveals novel features of mouse circadian transcriptional regulation. *eLife*, 1, e00011. <https://doi.org/10.7554/eLife.00011>
- Millichap, J. G. (2008). Etiologic Classification of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Pediatrics*, 121(2), e358–e365. <https://doi.org/10.1542/peds.2007-1332>
- Mirunalini, S., & Subramanian, P. (2005). Temporal oscillations of thyroid hormones in long term melatonin treated rats. *Die Pharmazie*, 60(1), 52–56.
- Monteleone, P., & Maj, M. (2008). The circadian basis of mood disorders: Recent developments and treatment implications. *European Neuropsychopharmacology*, 18(10), 701–711. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2008.06.007>
- Moore, R. Y., & Lenn, N. J. (1972). A retinohypothalamic projection in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 146(1), 1–14. <https://doi.org/10.1002/cne.901460102>
- Moore, R. Y., & Speh, J. C. (2004). Serotonin innervation of the primate suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*, 1010(1–2), 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.02.024>

- Müller, M. J., & Haag, A. (2018). The concept of chronotypes and its clinical importance for depressive disorders. *The International Journal of Psychiatry in Medicine*, 53(3), 224–240. <https://doi.org/10.1177/0091217417749787>
- Nagoshi, E., Saini, C., Bauer, C., Laroche, T., Naef, F., & Schibler, U. (2004). Circadian Gene Expression in Individual Fibroblasts. *Cell*, 119(5), 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.015>
- Nakamaru-Ogiso, E., Miyamoto, H., Hamada, K., Tsukada, K., & Takai, K. (2012). Novel biochemical manipulation of brain serotonin reveals a role of serotonin in the circadian rhythm of sleep-wake cycles: Role of 5-HT in the sleep-wake circadian rhythm. *European Journal of Neuroscience*, 35(11), 1762–1770. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08077.x>
- Neuraxpharm®. (2013, Stand). *Fachinformation Fluvoxamin*.
- Nichols, D. E., & Nichols, C. D. (2008). Serotonin Receptors. *Chemical Reviews*, 108(5), 1614–1641. <https://doi.org/10.1021/cr078224o>
- Nomura, K., Castanon-Cervantes, O., Davidson, A., & Fukuhara, C. (2008). Selective serotonin reuptake inhibitors and raft inhibitors shorten the period of Period1-driven circadian bioluminescence rhythms in rat-1 fibroblasts. *Life Sciences*, 82(23–24), 1169–1174. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2008.03.024>
- Ottevanger, E. A. (1994). The efficacy of fluvoxamine in patients with severe depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 18(4), 731–740. [https://doi.org/10.1016/0278-5846\(94\)90080-9](https://doi.org/10.1016/0278-5846(94)90080-9)
- Palm, D., Uzoni, A., Kronenberg, G., Thome, J., & Faltraco, F. (2023). Human Derived Dermal Fibroblasts as in Vitro Research Tool to Study Circadian Rhythmicity in Psychiatric Disorders. *Pharmacopsychiatry*, 56(03), 87–100. <https://doi.org/10.1055/a-1147-1552>

- Palm, D., Uzoni, A., Simon, F., Tucha, O., Thome, J., & Faltraco, F. (2021). Norepinephrine influences the circadian clock in human dermal fibroblasts from study participants with a diagnosis of attention-deficit hyperactivity disorder. *Journal of Neural Transmission*, *128*(7), 1147–1157.  
<https://doi.org/10.1007/s00702-021-02376-2>
- Panda, S. (2016). Circadian physiology of metabolism. *Science*, *354*(6315), 1008–1015.  
<https://doi.org/10.1126/science.aah4967>
- Partonen, T., Treutlein, J., Alpman, A., Frank, J., Johansson, C., Depner, M., Aron, L., Rietschel, M., Wellek, S., Soronen, P., Paunio, T., Koch, A., Chen, P., Lathrop, M., Adolfsson, R., Persson, M., Kasper, S., Schalling, M., Peltonen, L., & Schumann, G. (2007). Three circadian clock genes *Per2*, *Arntl*, and *Npas2* contribute to winter depression. *Annals of Medicine*, *39*(3), 229–238.  
<https://doi.org/10.1080/07853890701278795>
- Peliciari-Garcia, R. A., Bargi-Souza, P., Young, M. E., & Nunes, M. T. (2018). Repercussions of hypo and hyperthyroidism on the heart circadian clock. *Chronobiology International*, *35*(2), 147–159. <https://doi.org/10.1080/07420528.2017.1388253>
- Peltier, M. R., Fassett, M. J., Chiu, V. Y., & Getahun, D. (2021). Maternal Hypothyroidism Increases the Risk of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder in the Offspring. *American Journal of Perinatology*, *38*(02), 191–201.  
<https://doi.org/10.1055/s-0040-1717073>
- Perse, T. L., Greist, J. H., Jefferson, J. W., Rosenfeld, R., & Dar, R. (1987). Fluvoxamine treatment of obsessive-compulsive disorder. *The American Journal of Psychiatry*, *144*(12), 1543–1548.  
<https://doi.org/10.1176/ajp.144.12.1543>
- Philippe, J., & Dibner, C. (2015). Thyroid Circadian Timing: Roles in Physiology and Thyroid Malignancies. *Journal of Biological Rhythms*, *30*(2), 76–83.  
<https://doi.org/10.1177/0748730414557634>

- Pickard, G. E., Smith, B. N., Belenky, M., Rea, M. A., Dudek, F. E., & Sollars, P. J. (1999). 5-HT1B receptor-mediated presynaptic inhibition of retinal input to the suprachiasmatic nucleus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *19*(10), 4034–4045.
- Pilorz, V., Helfrich-Förster, C., & Oster, H. (2018). The role of the circadian clock system in physiology. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *470*(2), 227–239. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-2103-y>
- Portas, C. M., Bjorvatn, B., & Ursin, R. (2000). Serotonin and the sleep/wake cycle: Special emphasis on microdialysis studies. *Progress in Neurobiology*, *60*(1), 13–35. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(98\)00097-5](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(98)00097-5)
- Qiagen GmbH. (2019, Oktober). *Qiagen RNeasy® Mini Handbook*.
- Ratiopharm®. (2019, Stand). *Fachinformation Sertralin*.
- Reis, G., dos Santos Moreira-Silva, E. A., Silva, D. C. M., Thabane, L., Milagres, A. C., Ferreira, T. S., dos Santos, C. V. Q., de Souza Campos, V. H., Nogueira, A. M. R., de Almeida, A. P. F. G., Callegari, E. D., de Figueiredo Neto, A. D., Savassi, L. C. M., Simplicio, M. I. C., Ribeiro, L. B., Oliveira, R., Harari, O., Forrest, J. I., Ruton, H., ... Mills, E. J. (2022). Effect of early treatment with fluvoxamine on risk of emergency care and hospitalisation among patients with COVID-19: The TOGETHER randomised, platform clinical trial. *The Lancet Global Health*, *10*(1), e42–e51. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(21\)00448-4](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(21)00448-4)
- Reppert, S. M., & Weaver, D. R. (2001). Molecular Analysis of Mammalian Circadian Rhythms. *Annual Review of Physiology*, *63*(1), 647–676. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.63.1.647>
- Reppert, S. M., & Weaver, D. R. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, *418*(6901), 935–941. <https://doi.org/10.1038/nature00965>

- Ressler, K. J., & Nemeroff, C. B. (2000). Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. *Depression and Anxiety, 12*(S1), 2–19.  
[https://doi.org/10.1002/1520-6394\(2000\)12:1+<2::AID-DA2>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1520-6394(2000)12:1+<2::AID-DA2>3.0.CO;2-4)
- Roenneberg, T., Kuehnle, T., Juda, M., Kantermann, T., Allebrandt, K., Gordijn, M., & Merrow, M. (2007). Epidemiology of the human circadian clock. *Sleep Medicine Reviews, 11*(6), 429–438.  
<https://doi.org/10.1016/j.smr.2007.07.005>
- Rosen, D. A., Seki, S. M., Fernández-Castañeda, A., Beiter, R. M., Eccles, J. D., Woodfolk, J. A., & Gaultier, A. (2019). Modulation of the sigma-1 receptor-IRE1 pathway is beneficial in preclinical models of inflammation and sepsis. *Science Translational Medicine, 11*(478), eaau5266.  
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau5266>
- Rota, E., Broda, R., Cangemi, L., Migliaretti, G., Paccotti, P., Rosso, C., Torre, E., Zeppegno, P., & Portaleone, P. (2005). Neuroendocrine (HPA axis) and clinical correlates during fluvoxamine and amitriptyline treatment. *Psychiatry Research, 133*(2–3), 281–284.  
<https://doi.org/10.1016/j.psychres.2003.12.030>
- Rozenblit-Susan, S., Chapnik, N., & Froy, O. (2016). Metabolic effect of fluvoxamine in mouse peripheral tissues. *Molecular and Cellular Endocrinology, 424*, 12–22.  
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.01.009>
- Russell, V. A., Sagvolden, T., & Johansen, E. B. (2005). Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. *Behavioral and Brain Functions: BBF, 1*, 9.  
<https://doi.org/10.1186/1744-9081-1-9>
- 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. *Comprehensive Psychiatry, 48*(6), 562–571.  
<https://doi.org/10.1016/j.comppsy.2007.05.008>

- Schmidt, S., Brähler, E., Petermann, F., & Koglin, U. (2012). Komorbide Belastungen bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen mit ADHS. *Zeitschrift für Psychiatrie, Psychologie und Psychotherapie*, *60*(1), 015–026.  
<https://doi.org/10.1024/1661-4747/a000094>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, *3*(6), 1101–1108.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Shahpasand, K., Uemura, I., Saito, T., Asano, T., Hata, K., Shibata, K., Toyoshima, Y., Hasegawa, M., & Hisanaga, S.-I. (2012). Regulation of mitochondrial transport and inter-microtubule spacing by tau phosphorylation at the sites hyperphosphorylated in Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *32*(7), 2430–2441.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5927-11.2012>
- Sharma, V. K. (2003). Adaptive Significance of Circadian Clocks. *Chronobiology International*, *20*(6), 901–919. <https://doi.org/10.1081/CBI-120026099>
- Shea, S. A., Hilton, M. F., Hu, K., & Scheer, F. A. J. L. (2011). Existence of an Endogenous Circadian Blood Pressure Rhythm in Humans That Peaks in the Evening. *Circulation Research*, *108*(8), 980–984.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.233668>
- Smith, B. N., Sollars, P. J., Dudek, F. E., & Pickard, G. E. (2001). Serotonergic Modulation of Retinal Input to the Mouse Suprachiasmatic Nucleus Mediated by 5-HT1B and 5-HT7 Receptors. *Journal of Biological Rhythms*, *16*(1), 25–38.  
<https://doi.org/10.1177/074873040101600104>
- 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. *Sleep*, *31*(3), 375–381.  
<https://doi.org/10.1093/sleep/31.3.375>

- Soria, V., Martínez-Amorós, È., Escaramís, G., Valero, J., Pérez-Egea, R., García, C., Gutiérrez-Zotes, A., Puigdemont, D., Bayés, M., Crespo, J. M., Martorell, L., Vilella, E., Labad, A., Vallejo, J., Pérez, V., Menchón, J. M., Estivill, X., Gratacòs, M., & Urretavizcaya, M. (2010). Differential Association of Circadian Genes with Mood Disorders: CRY1 and NPAS2 are Associated with Unipolar Major Depression and CLOCK and VIP with Bipolar Disorder. *Neuropsychopharmacology*, *35*(6), 1279–1289. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.230>
- Souetre, E., Salvati, E., Wehr, T. A., Sack, D. A., Krebs, B., & Darcourt, G. (1988). Twenty-four-hour profiles of body temperature and plasma TSH in bipolar patients during depression and during remission and in normal control subjects. *The American Journal of Psychiatry*, *145*(9), 1133–1137. <https://doi.org/10.1176/ajp.145.9.1133>
- Sprouse, J., Braselton, J., & Reynolds, L. (2006). Fluoxetine Modulates the Circadian Biological Clock via Phase Advances of Suprachiasmatic Nucleus Neuronal Firing. *Biological Psychiatry*, *60*(8), 896–899. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.03.003>
- Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*, *111*(1). <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>
- Taillard, J., Sagaspe, P., Philip, P., & Bioulac, S. (2021). Sleep timing, chronotype and social jetlag: Impact on cognitive abilities and psychiatric disorders. *Biochemical Pharmacology*, *191*, 114438. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114438>
- Takahashi, J. S., Hong, H.-K., Ko, C. H., & McDearmon, E. L. (2008). The genetics of mammalian circadian order and disorder: Implications for physiology and disease. *Nature Reviews Genetics*, *9*(10), 764–775. <https://doi.org/10.1038/nrg2430>
- Takashima, A. (1998). Establishment of Fibroblast Cultures. *Current Protocols in Cell Biology*, *00*(1). <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0201s00>
- Thaben, P. F., & Westermark, P. O. (2016). Differential rhythmicity: Detecting altered rhythmicity in biological data. *Bioinformatics*, *32*(18), 2800–2808. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw309>

- Trepel, M. (2022). *Neuroanatomie: Struktur und Funktion* (8. Auflage). Elsevier.
- Turek, F. W., Joshu, C., Kohsaka, A., Lin, E., Ivanova, G., McDearmon, E., Laposky, A., Losee-Olson, S., Easton, A., Jensen, D. R., Eckel, R. H., Takahashi, J. S., & Bass, J. (2005). Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science*, *308*(5724), 1043–1045.  
<https://doi.org/10.1126/science.1108750>
- Uddin, M. S., Tewari, D., Mamun, A. A., Kabir, M. T., Niaz, K., Wahed, M. I. I., Barreto, G. E., & Ashraf, G. M. (2020). Circadian and sleep dysfunction in Alzheimer’s disease. *Ageing Research Reviews*, *60*, 101046.  
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101046>
- van Andel, E., Bijlenga, D., Vogel, S. W. N., Beekman, A. T. F., & Kooij, 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. *Chronobiology International*, *38*(2), 260–269.  
<https://doi.org/10.1080/07420528.2020.1835943>
- Van Cauter, E., Leclercq, R., Vanhaelst, L., & Golstein, J. (1974). Simultaneous Study of Cortisol and TSH Daily Variations in Normal Subjects and Patients with Hyperadrenalcorticism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *39*(4), 645–652. <https://doi.org/10.1210/jcem-39-4-645>
- van de Loo, I., & Harbeck, B. (2020). *Facharztwissen Endokrinologie und Diabetologie: Klinik, Diagnostik, Therapie*. Springer Berlin Heidelberg.  
<https://doi.org/10.1007/978-3-662-58897-0>
- van der Merwe, C., Münch, M., & Kruger, R. (2022). Chronotype Differences in Body Composition, Dietary Intake and Eating Behavior Outcomes: A Scoping Systematic Review. *Advances in Nutrition*, *13*(6), 2357–2405.  
<https://doi.org/10.1093/advances/nmac093>

- Villanger, G. D., Ystrom, E., Engel, S. M., Longnecker, M. P., Pettersen, R., Rowe, A. D., Reichborn-Kjennerud, T., & Aase, H. (2020). Neonatal thyroid-stimulating hormone and association with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, *34*(5), 590–596. <https://doi.org/10.1111/ppe.12643>
- Wang, Y., Peng, S., Liu, T., Zhang, Y., Li, H., Li, X., Tao, W., & Shi, Y. (2020). The potential role of clock genes in children attention-deficit/hyperactivity disorder. *Sleep Medicine*, *71*, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2020.02.021>
- Weaver, D. R. (1999). *Melatonin and Circadian Rhythmicity in Vertebrates: Physiological Roles and Pharmacological Effects*. In: *Regulation of sleep and circadian rhythms* (F. W. Turek & P. C. Zee, Hrsg.; S. 196–262). M. Dekker.
- Williams, G. R. (2011). Extrathyroidal expression of TSH receptor. *Annales d'Endocrinologie*, *72*(2), 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2011.03.006>
- Wörmann, B. (2022, Februar 9). *Antivirale Arzneimittel zur Therapie von COVID-19 (Behandlung von nicht-hospitalisierten Patient\*innen1 mit COVID-19 und erhöhtem Risiko für einen schweren Verlauf)*. [https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges\\_Coronavirus/Therapie/AWMF\\_S\\_TAKOB\\_Stellungnahme\\_Arzneimittel.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Therapie/AWMF_S_TAKOB_Stellungnahme_Arzneimittel.pdf?__blob=publicationFile)
- XIV. On the temperature of man. (1845). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, *135*, 319–333. <https://doi.org/10.1098/rstl.1845.0014>
- Xu, X., Breen, G., Chen, C.-K., Huang, Y.-S., Wu, Y.-Y., & Asherson, P. (2010). Association study between a polymorphism at the 3'-untranslated region of CLOCK gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Behavioral and Brain Functions: BBF*, *6*, 48. <https://doi.org/10.1186/1744-9081-6-48>
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G. D., Sakaki, Y., Menaker, M., & Tei, H. (2000). Resetting Central and Peripheral Circadian Oscillators in Transgenic Rats. *Science*, *288*(5466), 682–685. <https://doi.org/10.1126/science.288.5466.682>

- Yoo, S.-H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., Siepk, S. M., Hong, H.-K., Oh, W. J., Yoo, O. J., Menaker, M., & Takahashi, J. S. (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(15), 5339–5346. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308709101>
- Yoon, S. Y. R., Jain, U., & Shapiro, C. (2012). Sleep in attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adults: Past, present, and future. *Sleep Medicine Reviews*, *16*(4), 371–388. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2011.07.001>
- Young, M. W. (2018). Reise durch die Zeit: 40 Jahre Forschung von den Clock-Mutanten in Drosophila zu Störungen des zirkadianen Rhythmus beim Menschen (Nobel-Vortrag). *Angewandte Chemie*, *130*(36), 11706–11713. <https://doi.org/10.1002/ange.201803337>
- Zader, S. J., Williams, E., & Buryk, M. A. (2019). Mental Health Conditions and Hyperthyroidism. *Pediatrics*, *144*(5), e20182874. <https://doi.org/10.1542/peds.2018-2874>
- Zhang, J., Chatham, J. C., & Young, M. E. (2020). Circadian Regulation of Cardiac Physiology: Rhythms That Keep the Heart Beating. *Annual Review of Physiology*, *82*(1), 79–101. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114349>
- Zisapel, N. (2018). New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation: Melatonin in human sleep and circadian rhythms. *British Journal of Pharmacology*, *175*(16), 3190–3199. <https://doi.org/10.1111/bph.14116>

## 7. Anhang

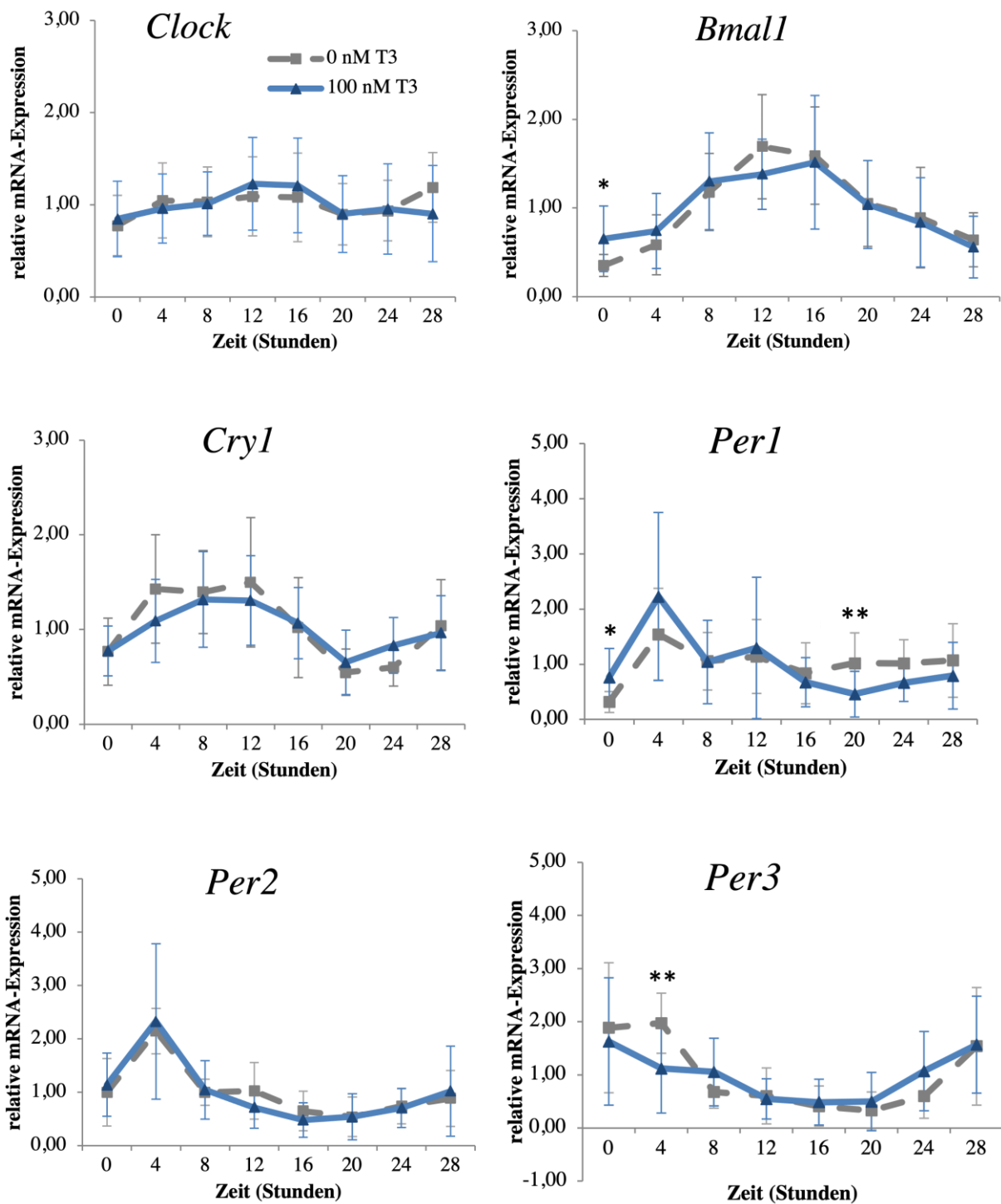


Abbildung 14: Relative mRNA-Genexpression von zirkadianen Genen bei Proband:innen ohne neuropsychiatrische Diagnose nach Inkubation mit 0 und 100 nM T3, n=12. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$

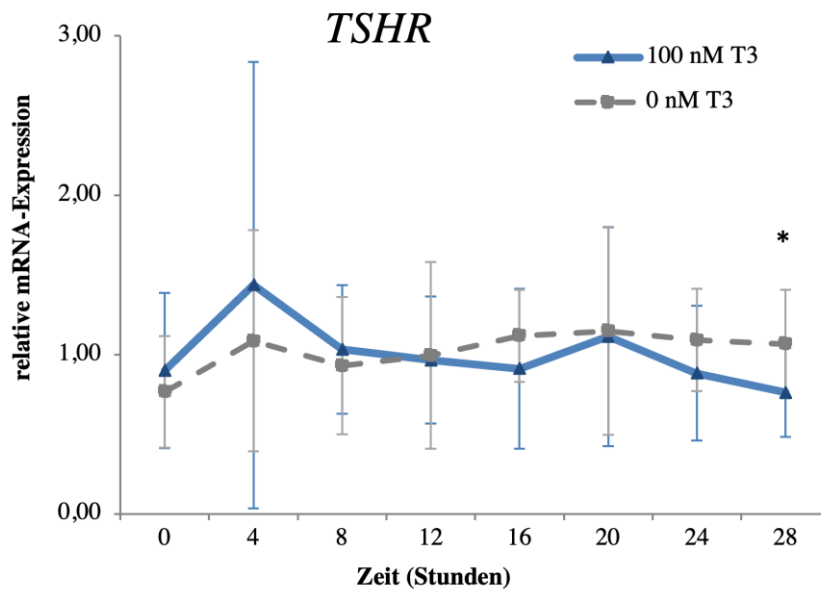


Abbildung 15: Relative mRNA-Expression des TSH-Rezeptors bei Proband:innen ohne neuropsychiatrische Diagnose nach Inkubation mit 0 und 100 nM T3, n=12. \* $p < 0,05$

Demographische Daten	Proband:innen (n=12)
Alter	50.08 ± 16.65 Jahre
weibliche Patientinnen	8 (66.7 %)
BMI	27.91 ± 7.11
MWT	109.25 ± 9.56
D-MEQ	61.33 ± 9.06
Chronotyp	Neutraltyp 5 (41.7 %) Moderater Morgentyp 5 (41.7 %) Definitiver Morgentyp 2 (16.7 %)

Tabelle 10: Demografische Daten der Proband:innen ohne neuropsychiatrische Diagnose für T3-Studie

	0 µM Fluvoxamin		5 µM Fluvoxamin	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
<i>Cry1</i> ZP 4	1,5091	0,6995	0,9673	0,3981
<i>Cry1</i> ZP 20	0,4741	0,1990	0,8790	0,5518
<i>Per1</i> ZP 4	1,4566	0,9401	2,1532	0,9302
<i>Per2</i> ZP 4	1,9907	0,6102	2,8196	1,5037
<i>Per3</i> ZP 0	1,6312	0,9541	2,7177	0,9886

Tabelle 11: Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) für die statistisch signifikanten Zeitpunkte der zirkadianen Genexpression nach Inkubation mit 0 µM und 5 µM Fluvoxamin

	Morgentyp				Neutraltyp			
	0 $\mu$ M Fluvoxamin		5 $\mu$ M Fluvoxamin		0 $\mu$ M Fluvoxamin		5 $\mu$ M Fluvoxamin	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
<i>Bmal1</i> ZP 4	0,095	0,287	0,217	0,309	0,847	0,359	0,700	0,600
<i>Bmal1</i> ZP 16	0,326	0,681	0,600	0,266	1,040	0,568	1,414	1,751
<i>Bmal1</i> ZP 20	0,387	0,420	0,685	0,360	0,773	0,373	0,973	1,209
<i>Cry1</i> ZP 4	0,315	0,615	0,177	0,288	1,852	0,754	1,076	0,848
<i>Per3</i> ZP 0	0,780	1,181	1,062	0,456	1,457	0,535	3,005	2,026

**Tabelle 12: Mittelwerte (M) und Standardabweichungen (SD) für die statistisch signifikanten Zeitpunkte der Genexpression nach Fluvoxamin-Inkubation, aufgeschlüsselt nach Chronotyp**

	0 nM T3		100 nM T3	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
<i>Clock</i> ZP 12	1,125	0,304	0,673	0,553
<i>Bmal1</i> ZP 0	0,341	0,100	1,234	1,696
<i>Bmal1</i> ZP 8	1,258	0,349	0,733	0,317
<i>Bmal1</i> ZP 12	1,549	0,471	0,786	0,495
<i>Bmal1</i> ZP 28	0,487	0,288	1,493	1,380
<i>Cry1</i> ZP 4	1,628	0,429	0,669	0,576
<i>Cry1</i> ZP 8	1,538	0,358	0,836	0,521
<i>Cry1</i> ZP 20	0,538	0,144	1,182	0,674
<i>Cry1</i> ZP 24	0,482	0,271	1,304	0,977
<i>Cry1</i> ZP 28	0,564	0,166	1,344	1,226
<i>Per1</i> ZP 0	0,156	0,096	0,567	0,496
<i>Per1</i> ZP 4	1,580	0,881	0,725	0,910
<i>Per1</i> ZP 8	2,031	1,733	0,793	0,806
<i>Per1</i> ZP 16	0,591	0,442	1,969	1,563
<i>Per1</i> ZP 20	0,989	0,752	0,967	1,036
<i>Per1</i> ZP 28	0,348	0,323	1,114	1,239
<i>Per2</i> ZP 4	1,847	0,614	0,969	0,565
<i>Per2</i> ZP 8	1,145	0,448	0,736	0,390
<i>Per2</i> ZP 24	0,625	0,266	1,395	0,598
<i>Per3</i> ZP 0	3,424	1,503	1,593	1,332
<i>Per3</i> ZP 4	1,449	0,896	1,277	0,929
<i>Per3</i> ZP 24	0,369	0,225	1,129	0,752
<i>TSH</i> ZP 20	0,966	0,162	1,607	0,547

**Tabelle 13: Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) für die statistisch signifikanten Zeitpunkte der zirkadianen Genexpression nach Inkubation mit 0 nM und 100 nM T3**

## Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Leipzig,

den 08.02.2024

---

Abgabedatum

---

Unterschrift

## **Danksagung**

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. Johannes Thome danke ich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Dissertation und für die Begutachtung meiner Arbeit. Ich danke Ihnen für Ihr Vertrauen und Ihre Unterstützung.

Ich bedanke mich ebenfalls bei Herrn Dr. Frank Faltraco für meine Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Überlassung des interessanten Themas.

Ein besonderer Dank geht an Frau Dr. Denise Palm und Frau Adriana Uzoni aus dem Labor für molekulare Psychiatrie für die überaus freundliche Arbeitsatmosphäre, die ausführliche Einarbeitung und die fortwährende Unterstützung. Ein herzliches Dankeschön für diese Zeit. Auch allen Mitdotorand:innen der Arbeitsgruppe danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit, insbesondere Esther und Caro – mit euch war die Zeit im Labor besonders schön.

Des Weiteren danke ich meiner Familie und meinen lieben Freunden, die mich während meines Studiums und den Jahren der Dissertation begleitet und unterstützt haben. Vielen Dank für die vielen Gespräche, das Korrekturlesen und das Beiseitestehen zu jeder Zeit. Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Willi für die emotionale Unterstützung und die stetige Ermutigung. Danke!

## Thesen

1. Grundlage des zirkadianen Rhythmus im menschlichen Organismus sind die sogenannten „Uhrengene“. Diese zirkadianen Gene wurden bislang in allen untersuchten Geweben gefunden, u.a. in humanen dermalen Fibroblasten (HDF).
2. Eine Störung des zirkadianen Rhythmus wirkt sich auf den Organismus aus und kann Erkrankungen wie z.B. Depressionen begünstigen. Auch die Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung (ADHS) ist mit zirkadianen Rhythmusstörungen assoziiert.
3. In bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass Substanzen die zirkadiane Genexpression in HDF beeinflussen können.
4. Unter der Einnahme des Serotonin-Wiederaufnahmehemmers Fluvoxamin konnten bereits Fälle eines verzögerten Schlafphasensyndroms (DSPS) beobachtet werden.
5. In HDF sorgte Fluvoxamin für eine signifikant veränderte Genexpression der zirkadianen Gene *Cry1* und *Per1-3*. Es zeigte sich die Tendenz einer Phasenverschiebung.
6. Bei der Verschreibung von Fluvoxamin sollte auf Veränderungen im Tag-Nacht-Rhythmus geachtet werden. Bei Symptomen wie Tagesmüdigkeit und Schlaflosigkeit unter der Therapie sollte ein DSPS in Betracht gezogen werden.
7. Mehrere tierexperimentelle Studien zeigten, dass Schilddrüsenhormone die zirkadiane Genexpression beeinflussen. Darüber hinaus konnte in bisherigen Studien ein positiver Zusammenhang zwischen dem T3-Spiegel und dem Auftreten von ADHS-Symptomen gefunden werden.
8. In HDF von ADHS-Patient:innen sorgte T3 für eine veränderte zirkadiane Genexpression in allen untersuchten zirkadianen Genen (*Clock*, *Bmal1*, *Cry1*, *Per1-3*). Dabei sorgte T3 für eine Phasenverschiebung der Genexpression um 8 bis 16 Stunden.
9. ADHS-Patient:innen weisen im Gegensatz zu Personen ohne neuropsychiatrische Diagnose eine Abweichung des Chronotyps auf. Die Prävalenz des Abendtyps ist bei Patient:innen

mit ADHS deutlich erhöht. T3 besitzt im humanen dermalen Fibroblastenmodell eine Zeitgeberfunktion, welche für eine Verstärkung der Abendpräferenz sorgt.

10. Die Ausprägung des Abendtyps bei ADHS-Patient:innen ist mit einem höheren Schweregrad der Symptomatik assoziiert. Hohe T3-Spiegel könnten demnach zu einer Verstärkung der ADHS-Symptomatik führen.