

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. Johannes Thome

**Einfluss von Dopamin auf die zirkadiane Rhythmik adulter
ADHS-Patienten*innen**

INAUGURALDISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOKTOR DER ZAHNMEDIZIN

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT ROSTOCK

vorgelegt von

Lena Borchert, geb. am 12.12.1997 in Crivitz

Rostock, 2025

Dekan: Prof. Dr. med. Bernd J. Krause

Themenvergabe: Prof. Dr. med. Dr. phil. Johannes Thome
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
Zentrum für Nervenheilkunde
Universitätsmedizin Rostock
Gehlsheimer Straße 20
18147 Rostock

Betreuung der Arbeit: Dr. med. Frank Faltraco
Labor für Molekulare Psychiatrie
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
Zentrum für Nervenheilkunde
Universitätsmedizin Rostock
Gehlsheimer Straße 20
18147 Rostock

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Dr. phil. Johannes Thome
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
Universitätsmedizin Rostock
2. Prof. Dr. med. Birgit Völlm, PhD
Klinik für Forensische Psychiatrie
Universitätsmedizin Rostock
3. Prof. Dr. med. Hans J. Grabe
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
Universitätsmedizin Greifswald

Jahr der Einreichung: 2025

Jahr der Verteidigung: 2026

Meinen Eltern

Inhalt

Zusammenfassung.....	1
Abstract	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS)	3
1.2. Zirkadiane Rhythmik	7
1.3 Dopamin	11
1.4 Humane dermale Fibroblasten	14
1.5 Fragestellung der vorliegenden Arbeit	16
2 Methoden und Materialien	17
2.1 Liste der verwendeten Materialien	17
2.2 Einschluss der Studienteilnehmer*innen und psychometrische Testverfahren	19
2.3 Kultivierung humaner dermaler Fibroblasten.....	20
2.4 Passagieren der Zellen	21
2.5 Kontrolle der Viabilität der Zellen.....	22
2.6 Untersuchung des Zellwachstums	23
2.7 Synchronisation der Zellen und 28 h-Experiment	23
2.8 RNA-Isolation.....	24
2.9 Reverse Transkription / Erststrang-cDNA-Synthese	25
2.10 Quantitative Real-Time PCR.....	25
2.11 Statistische Auswertung der Ergebnisse	31
3 Ergebnisse	32
3.1 Demographische Daten.....	32
3.2 Viabilitätstest humaner dermaler Fibroblastenkulturen.....	33
3.3 Zirkadiane Genexpression in humanen dermalen Fibroblasten (ADHS, HC) nach Zugabe von Dopamin	35
4 Diskussion.....	40
5 Schlussfolgerung und Ausblick.....	44
Anhang.....	45

Ergänzende Materialien	45
Literaturverzeichnis	50
Abbildungsverzeichnis	65
Tabellenverzeichnis	66
Abkürzungsverzeichnis.....	67
Thesen.....	70
Eidesstattliche Erklärung.....	72
Danksagung	73
Publikation.....	74

Zusammenfassung

Patienten*innen mit Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS) sind häufiger von Störungen der zirkadianen Rhythmik betroffen als die durchschnittliche Bevölkerung. Verschiedene Methoden wie medikamentöse Therapie, Lichttherapie etc. wurden bereits versucht, um dieses Problem, das oft andere Symptome der Patienten*innen weiter verstärkt, zu lösen. Da Dopamin eine zentrale Rolle bei der Pathophysiologie und Therapie der ADHS spielt, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob der Neurotransmitter die zirkadiane Rhythmik beeinflussen kann. Hierzu wurden ein Zellmodell mit humanen dermalen Fibroblasten aus Biopsien gesunder Probanden*innen und von ADHS-Patienten*innen untersucht und der Einfluss verschiedener Dopamin-Konzentrationen auf die Expression von zirkadianen Genen im Tagesverlauf mittels qRT-PCR analysiert.

Es zeigte sich, dass bei variierenden Dopaminkonzentrationen (0, 1 und 10 μM) statistisch signifikante Unterschiede der Expression einiger Gene sowohl innerhalb der ADHS-Gruppe als auch in der Kontrollgruppe sowie zwischen den beiden Gruppen bestanden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Dopamin einen Einfluss auf die zirkadiane Rhythmik von ADHS-Patienten*innen haben könnte. Dies ist ein möglicher Hinweis, dass ADHS-Medikamente wie Methylphenidat die zirkadiane Rhythmik stören oder auch normalisieren können und dass deren Einnahmezeitpunkt von großer Bedeutung ist, um die Belastung der Patienten*innen durch unerwünschte Wirkungen gering zu halten. Weitere Studien sind notwendig, um diese Erkenntnisse genauer zu untersuchen.

Abstract

Patients with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) are more often affected by circadian rhythm disorders than the average population. Various methods such as drug therapy, light therapy etc. have been tried to solve this problem, which often further exacerbates some of patients' symptoms. Since dopamine plays a central role in the pathophysiology and therapy of ADHD, the following study examined whether the neurotransmitter can influence circadian rhythms. For this purpose, a cell model with human dermal fibroblasts from biopsies of healthy volunteers and ADHD patients was used and the influence of different dopamine concentrations on the expression of circadian genes over the course of the day was analyzed using qRT-PCR.

Data analysis showed that with varying dopamine concentrations (0, 1 and 10 μM) there were statistically significant differences in the expression of some genes both within the ADHD group and in the control group as well as between the two groups. These results suggest that dopamine may have an influence on the circadian rhythms of ADHD patients. This is a possible indication that ADHD medications such as methylphenidate can disrupt or even normalize circadian rhythms and that the timing of their administration is very important in order to keep low the patient's burden of undesirable effects. Further studies are needed to examine these findings in more detail.

1 Einleitung

1.1 Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS)

Die Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS) ist eine der international häufigsten psychischen Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter mit einer Prävalenz von 3,7 % (Barican et al. 2022). Jedoch setzt sich diese in ein bis zwei Drittel der Fälle bis ins Erwachsenenalter fort (Wender et al. 2001) und ist damit auch in dieser Altersgruppe keine seltene Diagnose.

Während in der Kindheit mit einem Geschlechterverhältnis von 3:1 Jungen häufiger betroffen sind, ist die Prävalenz der ADHS bei erwachsenen Frauen und Männern annähernd gleich, da die Erkrankung bei weiblichen Patientinnen oft erst im Erwachsenenalter diagnostiziert wird (Da Silva et al. 2020). Symptome der Hyperaktivität und Impulsivität (siehe Tabelle 1) zeigen häufig eine ausgeprägtere und frühere Remission in der Entwicklung vom Kindes- zum Erwachsenenalter, als Symptome der Unaufmerksamkeit (Biederman et al. 2000). Die Hyperaktivität äußert sich im Kindesalter eher durch Bewegungsunruhe, in der weiteren Entwicklung tritt sie eher als innere Unruhe oder Fahrigkeit in Erscheinung (Banaschewski et al. 2017).

Typische Merkmale der ADHS werden durch die DSM-IV/DSM-V der American Psychiatric Association und durch die ICD-10 der Weltgesundheitsorganisation beschrieben. Kriterien für die Diagnostik sind: eine Dauer der Symptome von mindestens 6 Monaten, ein Beginn der Erkrankung in der Kindheit (DSM-V bis 12 Jahre, ICD-10 bis 7 Jahre) und ein situationsübergreifendes Auftreten. Die Kernsymptomatik wird beschrieben als Unaufmerksamkeit und/oder motorische Unruhe und Impulsivität, die nicht altersentsprechend ist oder der allgemeinen Intelligenz der Patienten*innen entspricht. Außerdem müssen die Patienten*innen durch die Symptomatik in mehreren Lebensbereichen funktionell deutlich eingeschränkt sein, wie Schule, Beruf oder im Privaten (Freundschaften, Familie/Partnerschaft etc.) (American Psychiatric Association 2013).

In der DSM-V werden 3 verschiedene Erscheinungsformen der ADHS unterteilt: die vorwiegend unaufmerksame, die vorwiegend hyperaktiv-impulsive und die kombinierte Erscheinungsform. Dabei müssen im Kindesalter jeweils mindestens 6 der 9 Symptome erfüllt sein. Bei Jugendlichen oder Erwachsenen reichen dagegen 5 Symptome der jeweiligen Kategorie aus. In der folgenden Tabelle sind die Kriterien zur Klassifikation nach DSM-V (American Psychiatric Association 2013) dargestellt:

Tabelle 1: Kriterien zur Klassifikation der ADHS modifiziert nach DSM-V (American Psychiatric Association 2013)

Unaufmerksamkeit	Hyperaktivität/Impulsivität
Häufig Misserfolge bei Aufmerksamkeit auf kleine Details, häufige Flüchtigkeitsfehler	Macht häufig nervöse Bewegungen mit Händen, Füßen bzw. kann nicht still sitzen
Häufig Schwierigkeiten, die Aufmerksamkeit bei Aufgaben oder beim Spielen aufrecht zu erhalten	Verlässt häufig den Platz, wenn sitzen erwartet wird (in Schule, Beruf oder anderen Situationen)
Scheint häufig nicht zuzuhören, wenn er/sie direkt angesprochen wird (abwesend auch ohne offensichtliche Ablenkung)	Läuft oder klettert häufig in Situationen, in denen das unangebracht ist
Folgt häufig Anweisungen nicht vollständig, beginnt, aber beendet Schul-/Haushaltsaufgaben nicht	Ist häufig nicht fähig, sich beim Spielen/bei Freizeitaktivitäten ruhig zu verhalten
Hat häufig Schwierigkeiten, Aufgaben zu organisieren, Ordnung zu halten, Fristen einzuhalten	Ist häufig auf dem Sprung, wirkt angetrieben, unfähig oder fühlt sich unwohl für eine längere Zeit ruhig zu bleiben
Vermeidet häufig anstrengende oder mental herausfordernde Aufgaben	Redet häufig übermäßig
Verliert häufig Dinge, die für Aufgaben oder Aktivitäten notwendig sind	Kann häufig Antworten nicht abwarten, redet anderen dazwischen
Ist häufig leicht abgelenkt von externen Stimuli	Hat häufig Schwierigkeiten, zu warten bis er/sie dran ist (in einer Schlange etc.)
Ist häufig vergesslich bei Alltagsaktivitäten (Aufgaben erledigen, Haushalt, Anrufe, Rechnungen begleichen etc.)	Unterbricht häufig andere oder mischt sich ein (Gespräche, Aktivitäten), benutzt ungefragt Dinge anderer Leute

ADHS tritt häufig in Kombination mit anderen psychiatrischen Erkrankungen auf. Während die Prävalenz in der Bevölkerung durchschnittlich 46,4 % beträgt (Kessler et al. 2005), haben bis zu 89 % der ADHS-Patienten*innen eine weitere psychiatrische Diagnose (Sobanski et al. 2007). Im Kindes- und Jugendalter treten als Komorbidität häufig Angststörungen (37,9 %) und Verhaltensstörungen (31 %) auf (Mohammadi et al. 2021). Adulte ADHS ist häufig kombiniert mit Angststörungen (z.B. soziale Phobien 29,3 %), affektiven Störungen (z.B. bipolare Störungen 19,4 %, schwere Depression 18,6 %), Impulskontrollstörungen (19,6 %) und Substanzmissbrauch (15,2 %) (Kessler 2006).

Die exakte **Pathophysiologie** der ADHS ist nicht abschließend geklärt. Mehrere mögliche Einflussfaktoren wurden bereits in verschiedenen Studien untersucht, dabei scheinen sowohl genetische als auch umweltbedingte Faktoren eine Rolle zu spielen und deren Kombination zur Manifestation der Erkrankung zu führen (Faraone et al. 2015).

Laut einer Metaanalyse beträgt die Erbllichkeit der ADHS im Durchschnitt 76 % (Faraone et al. 2005). Dabei sind es polygenetische Veränderungen, die mit dem Auftreten von ADHS korrelieren (Demontis et al. 2019). Auf der Seite der umweltbedingten Faktoren wurde in verschiedenen Studien ein Zusammenhang mit Frühgeburt, geringem Geburtsgewicht, pränatalem Rauchen oder Alkoholkonsum der Mutter, Einnahme von Paracetamol in der Schwangerschaft durch die Mutter und pränataler Exposition mit bestimmten Toxinen aus der Umwelt vermutet. Ein kausaler Zusammenhang konnte aber bislang nicht nachgewiesen werden (Sciberras et al. 2017).

Eine Erkenntnis der letzten Jahre ist, dass ADHS nicht nur eine Erkrankung des Kindes- und Jugendalters ist, sondern sich auch ins **Erwachsenenalter** fortsetzen kann (Wender et al. 2001). In einigen Studien wurde zudem die Möglichkeit der Erstmanifestation der Krankheit im (jungen) Erwachsenenalter untersucht (Asherson und Agnew-Blais 2019).

Die Prävalenz der ADHS im Erwachsenenalter unterscheidet sich im internationalen Vergleich. Durchschnittlich beträgt sie 3,4 %, Deutschland weicht mit 3,1 % kaum davon ab, dagegen hat Frankreich mit 7,3 % eine signifikant höhere und die Länder Kolumbien (1,9 %), Libanon (1,8 %), Mexiko (1,9 %) und Spanien (1,2 %) eine signifikant niedrigere Prävalenz der Erkrankung (Fayyad et al. 2007). Aktuelle Studien gehen von einer globalen Prävalenz von 2,58 % aus (Song et al. 2021).

In der Entwicklung vom Vorschul- bis ins junge Erwachsenenalter ändert sich die Verteilung der Subtypen. Dabei sinkt der Anteil des hyperaktiv-impulsiven und kombinierten Subtyps, während der unaufmerksame Subtyp zunimmt und im Erwachsenenalter den größten Anteil hat (Willcutt 2012).

Während die ADHS im Kindesalter meist im Schulalltag auffällt und daraufhin diagnostiziert wird, treten die Symptome bei Erwachsenen in anderen Bereichen in Erscheinung. Häufig berichten Betroffene von Schwierigkeiten bei der Arbeit, in der Partnerschaft oder allgemein bei organisatorischen Angelegenheiten im Alltag. So lassen sich ADHS-Patienten*innen häufiger scheiden als Kontrollpersonen (9,2 % bzw. 3,3 %) (Soares et al. 2021). ADHS in der Kindheit ist verknüpft mit einem früheren Gebrauch von Zigaretten, Alkohol, Marihuana und Kokain (Dunne et al. 2014). Finanzielle Entscheidungen sind für ADHS-Patienten*innen schwieriger, sie haben öfter Schulden und ein geringeres Einkommen als Vergleichspersonen

ohne ADHS (Bangma et al. 2019; Koerts et al. 2021). Außerdem ist das Risiko von Unfällen und Verletzungen bei ADHS-Patienten*innen erhöht (Brunkhorst-Kanaan et al. 2021).

Im Erwachsenenalter sind die Symptome der ADHS meist subtiler als in der Kindheit. So kann sich Hyperaktivität zeigen in ständiger Aktivität, Verplanung der Freizeit oder durch die Wahl einer anspruchsvollen Arbeitsstelle. Impulsivität kann sich als spontanes Beenden von Arbeitsverhältnissen oder Beziehungen sowie Ungeduld beim Warten darstellen. Der unaufmerksame Subtyp lässt sich leicht Ablenken und hat Schwierigkeiten mit dem Einhalten von Terminen und dem Zeitmanagement (Leffa et al. 2022).

Die **Diagnose** ADHS wird anhand der zuvor genannten Kriterien nach DSM-V bzw. ICD-10 durch Psychiater*innen oder Psychotherapeuten*innen gestellt. Hierzu wird neben diagnostischen Gesprächen mit Patienten*innen und Angehörigen die klinische Patientenhistorie herangezogen (American Psychiatric Association 2013). Darüber hinaus gibt es verschiedene psychometrische Tests, die die Diagnostik der Erkrankung unterstützen.

Die Wender Utah Rating Scale (WURS) ist ein Fragebogen zur Selbstbeurteilung für Erwachsene, bei dem die ADHS-Symptomatik im Kindesalter (8-10 Jahre) retrospektiv untersucht wird. Die Faktoren Emotionalität und Aufmerksamkeitsstörung, Impulsivität, unreife Persönlichkeitseigenschaften und Verhaltensweisen, Protestverhalten, Konzentrationsstörungen/Überaktivität, Störung der sozialen Adaptation und Schulerfolg werden in verschiedenen Aussagen abgefragt und mit einem Punktesystem bewertet. Eine hohe Punktzahl gibt einen Hinweis auf das mögliche Vorliegen einer ADHS-Symptomatik im Kindesalter (Retz-Junginger et al. 2003).

Das Strukturierte Klinische Interview für DSM-IV (SKID) ist ein Testverfahren zur Diagnostik psychischer Störungen nach DSM-IV. SKID-I wurde für psychische Störungen und SKID-II für Persönlichkeitsstörungen entwickelt. Beide Verfahren sind als Leitfadeninterview hilfreich zur Differentialdiagnostik psychischer Erkrankungen (Wittchen et al. 1997).

Das Diagnostische Interview für ADHS bei Erwachsenen (DIVA 2.0) ist ebenfalls ein strukturiertes Interview, allerdings ausschließlich mit Bezug auf ADHS (Kooij und Francken 2010). Anhand von realistischen Beispielen sollen das aktuelle Verhalten der Patienten*innen und ihr Verhalten in der Kindheit sowie typische Funktionsbeeinträchtigungen in verschiedenen Lebensbereichen erfasst werden. Der Test untersucht die Leitsymptome der ADHS anhand der Kriterien nach DSM-IV (American Psychiatric Association 2000), Komorbiditäten werden jedoch nicht erfasst und müssen separat diagnostiziert bzw. ausgeschlossen werden (Kooij und Francken 2010).

Die Conners Adult ADHD Rating Scale (CAARS) ist ein weiteres psychometrisches Verfahren, welches entwickelt wurde, um die aktuelle AHDS-Symptomatik quantitativ zu erfassen. Es besteht aus einem Fragebogen zur Selbstbeurteilung sowie einem Fragebogen zur Fremdbeurteilung durch eine andere Person (Christiansen et al. 2012).

Der Morningness Eveningness Questionnaire (MEQ) ist ein Fragebogen zur Selbsteinschätzung der zirkadianen Phasenlage bzw. des Chronotyps der Teilnehmer*innen. Der Fragebogen besteht aus 19 Fragen, mit je 4 Antwortmöglichkeiten, die eine definitive Morgenpräferenz, eine moderate Morgenpräferenz, moderate Abendpräferenz sowie definitive Abendpräferenz repräsentieren. Je nach Gesamtpunktzahl können die Teilnehmer*innen so einer der Gruppen zugeordnet werden oder fallen in die Gruppe des neutralen Chronotyps (Horne und Ostberg 1977; Griefahn et al. 2001).

Der Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI) ist ein Fragebogen zur Beurteilung der Schlafqualität von Patienten*innen. Es untersucht die Komponenten subjektive Schlafqualität, Einschlafzeit, Schlafdauer, Schlaffeffizienz, Schlafstörungen, Gebrauch von Schlafmedikamenten und Beeinträchtigung der Tagesaktivität. Eine niedrige Punktzahl in der Auswertung spricht für eine gute Schlafqualität (Buysse et al. 1989). Der PSQI wird bei Patienten*innen mit einer ADHS-Diagnose verwendet, da in Studien gezeigt wurde, dass ADHS mit veränderter Schlafqualität und Störungen der zirkadianen Rhythmik assoziiert sind (Coogan et al. 2019).

1.2. Zirkadiane Rhythmik

Der Begriff zirkadiane Rhythmik hat seinen Ursprung in den lateinischen Wörtern circa (etwa) und dies (Tag) und beschreibt Vorgänge die sich mit einer Periodenlänge von annähernd 24 h wiederholen (Halberg und Stephens 1959). Dazu zählen u.a. der Schlaf-Wach-Rhythmus sowie die Schwankung von Hormonkonzentrationen im Blut (z.B. Cortisol oder Melatonin) und Körpertemperatur im Tagesverlauf.

Bei Säugetieren besteht das zirkadiane System aus einem zentralen Taktgeber, dem Nucleus suprachiasmaticus (SCN), welcher sich im Hypothalamus befindet und aus autonom oszillierenden Zellen besteht, und untergeordneten, peripheren Oszillatoren in fast allen Zellen des Körpers (Dibner et al. 2010). Der SCN hat ohne äußere Einflüsse einen selbstständigen Rhythmus, dessen Periodendauer beim Menschen durchschnittlich etwa 24,2 h beträgt (Czeisler et al. 1999).

Die Synchronisation des SCN erfolgt durch externe Einflüsse wie das Licht, das auf Retinazellen trifft und als elektrisches Signal zum SCN weitergeleitet wird. Über neuronale oder hormonelle Signalwege erfolgt die Synchronisation der peripheren Zellen (Dibner et al. 2010). Die zirkadiane Rhythmik dieser Zellen zeigt sich im Schwanken der Expression sogenannter zirkadianer Gene (Brown et al. 2005). Diese peripheren Oszillatoren werden nicht ausschließlich durch den SCN beeinflusst, sondern reagieren zum Beispiel auf verschiedene Substanzen mit einer veränderten Genexpression (Palm et al. 2021).

Die ersten **zirkadianen Gene** wurden zunächst an *Drosophila melanogaster* (Konopka und Benzer 1971), später auch an Mäusen (Sun et al. 1997) und schließlich in menschlichen Zellen nachgewiesen (Tei et al. 1997).

Der intrazelluläre molekulare Mechanismus der zirkadianen Abläufe beruht auf Transkriptions-Translations-Rückkopplungsschleifen („transcriptional-translational feedback loops“, TTFL). Bis zu 20 zirkadiane Gene und deren Proteinprodukte sind an der Entstehung zirkadianer Rhythmen beteiligt (Foster und Kreitzman 2014). Bei Säugetieren besteht eine Komponente des zirkadianen Systems aus den Proteinen CLOCK (Circadian locomotor output cycles kaput) und BMAL1 (Brain and muscle Arnt-like protein 1), welche als Heterodimer an die E-Box-Elemente in den Promotoren der Gene *Period* (*Per1/2/3*) und *Cryptochrome* (*Cry1/2*) binden und so deren Transkription induzieren. Die entstandenen Proteine (PER1/2/3, CRY1/2) akkumulieren im Tagesverlauf, translozieren nachts in den Zellkern und unterbinden als Dimere weitere Aktivität des CLOCK:BMAL1 Heterodimers. Im weiteren Verlauf der Nacht werden die PER/CRY-Komplexe abgebaut, so dass die Inaktivierung von CLOCK und BMAL1 zum nächsten Morgen wieder aufgehoben wird und der Zyklus von vorn beginnen kann (Buhr und Takahashi 2013; Husse et al. 2013; Mohawk et al. 2012).

Darüber hinaus sind weitere zirkadiane Gene bzw. deren Proteinprodukte an den molekularen Mechanismen beteiligt. DEC1 und DEC2 (Differentiated embryo chondrocyte expressed gene 1/2) werden durch das CLOCK:BMAL1-Heterodimer über eine E-Box im Promotor induziert und unterdrücken ihre eigene Expression und die Transkription von *Per1* indem sie mit CLOCK:BMAL1 um die Bindung im Promotor konkurrieren (Kato et al. 2014; Honma et al. 2002).

DBP (D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein) gehört zur Familie der PAR-Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktoren und aktiviert den *mPer1*-Promotor zusammen mit CLOCK:BMAL1 durch direkte Bindung an diesen und hat so Einfluss auf die zirkadiane Rhythmik (Yamaguchi et al. 2000; Lopez-Molina et al. 1997). Die *dbp*-Transkription wird

durch CLOCK:BMAL1 über E-Boxen aktiviert und durch die Proteine mPER und mCRY gehemmt (Yamaguchi et al. 2000).

REV-ERB α , REV-ERB β und ROR α (RAR-related orphan receptor alpha) bilden einen weiteren, akzessorischen Regulationskreis/Rückkopplungsschleife. REV-ERB α inhibiert zusammen mit REV-ERB β die *Bmal1*-Transkription durch die Bindung an RORE (retinoic acid-related orphan receptor response element-binding site) im *Bmal1*-Promotor, ROR α aktiviert die Transkription. Durch diese oszillierenden Einflüsse wird die rhythmische Expression von *Bmal1* etabliert (Cho et al. 2012). Die Expression von REV-ERB α wird durch die PER- und CRY-Komplexe inhibiert (Yang et al. 2009).

Diese oszillierenden Abläufe führen sowohl im SCN (Mohawk et al. 2012) als auch in peripheren Zellen (Yagita et al. 2001) zu einem annähernd 24-stündigen Rhythmus, welcher immer wieder einer Synchronisation durch äußere Einflüsse wie Licht oder Nahrungsaufnahme unterliegt.

Die zirkadiane Rhythmik wird regelmäßig durch zyklische Signale aus der Umwelt, die sogenannten **(exogenen) Zeitgeber**, synchronisiert (Aschoff 1954). Während die wichtigsten Zeitgeber für den SCN das Licht und die Nahrungsaufnahme sind, können periphere Oszillatoren auch direkt durch den Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme beeinflusst werden (Dibner et al. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass eine Nahrungsaufnahme zur eigentlichen Ruhephase (beim Menschen nachts, bei Nagetieren tagsüber) zu einer Entkopplung von SCN und peripheren Oszillatoren führt (Damiola et al. 2000).

Im Gegensatz zu anderen Organismen hat die Außentemperatur bei Säugetieren nur einen geringen Einfluss auf die zirkadiane Rhythmik, vor allem, weil sie als gleichwarme Tiere ihre Körpertemperatur regulieren können (Refinetti 2010).

Chemische Substanzen wie Methamphetamine können zu einer Desynchronisation des zirkadianen Systems führen (Pezuk et al. 2010). Im humanen Zellkulturmodell konnte gezeigt werden, dass die Zugabe des ADHS-Medikaments Atomoxetin oder von Noradrenalin die zirkadiane Genexpression beeinflusst (Palm et al. 2021; Faltraco et al. 2021).

Endogene Einflüsse wirken ebenfalls auf die zirkadiane Rhythmik. Hormone, vor allem Glukokortikoide, können die Expression zirkadianer Gene über GRE (Glucocorticoid-response elements) synchronisieren (Mohawk et al. 2012; Yamamoto et al. 2005). Auch Schwankungen der Körpertemperatur beeinflussen die zirkadiane Genexpression zwar nicht im SCN aber in peripheren Zellen wie Fibroblasten (Brown et al. 2002).

Störungen der zirkadianen Rhythmik zeigen sich als Schlaflosigkeit in Ruhephasen und übermäßige Schläfrigkeit in Wachphasen und entstehen durch Veränderungen des endogenen zirkadianen Systems oder durch eine Fehlanpassung zwischen dem Schlafzeitpunkt und dem externen Rhythmus der sozialen und physischen Umgebung (Barion und Zee 2007). Es gibt verschiedene Störungen der zirkadianen Rhythmik. Besonders interessant ist die Delayed Sleep Phase Disorder (DSPD, verzögertes Schlafphasensyndrom), da diese Störung häufig bei ADHS-Patienten*innen auftritt (Spera et al. 2020). Betroffene berichten typischerweise von Schwierigkeiten beim Einschlafen (durchschnittliche Einschlafzeit 4:00 Uhr) und dass sie ohne soziale Verpflichtungen (z.B. am Wochenende oder im Urlaub) ein spätes Aufstehen (durchschnittlich 10:38 Uhr) bevorzugen (Regestein und Monk 1995). Wenn die Patienten*innen sich nach den sozial erforderlichen Schlaf-Wach-Zeiten richten, zeigen sie klassische Symptome von Einschlafstörungen und Schwierigkeiten beim Aufwachen am Morgen für Arbeit, Schule oder andere soziale Verpflichtungen (Barion und Zee 2007).

In Studien mit Nagetieren konnte gezeigt werden, dass eine Störung der zirkadianen Rhythmik zu affektiven Veränderungen führen und eine gezielte Resynchronisation die Symptome affektiver Störungen verbessern kann (Walker et al. 2020).

Bei **ADHS-Patienten*innen** gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Störungen der zirkadianen Rhythmik bzw. des Schlaf-Wach-Rhythmus und ihrer Erkrankung (Gau et al. 2007; Wajszilber et al. 2018; Coogan et al. 2019). Dies zeigt sich in einer verlängerten Einschlafzeit, Durchschlafstörungen sowie späterem Aufwachen ohne Änderung der Gesamtschlafdauer (Snitselaar et al. 2017). Bei Studien mit Fragebögen zur subjektiven Einschätzung präferieren ADHS-Patienten*innen überwiegend spätere Tageszeiten und gehören dem späten Chronotyp (moderate/ausgeprägte Abendpräferenz) an, Personen ohne ADHS lassen sich durchschnittlich vorwiegend dem neutralen oder Morgentyp zuordnen (Baird et al. 2012; Durmuş et al. 2017).

Bis zu 83 % der erwachsenen ADHS-Patienten*innen weisen Schlafstörungen auf (Sobanski et al. 2008). Es konnte auch ein Zusammenhang zwischen ADHS-Medikation und Schlafstörungen in Placebo-kontrollierten Studien nachgewiesen werden (Wynchank et al. 2017). ADHS-Patienten*innen mit Einschlafstörungen haben einen späteren Einschlaf- und Aufwachzeitpunkt im Vergleich zu ADHS-Patienten*innen ohne Insomnie und im Vergleich zu Kontrollpersonen (van Veen et al. 2010). Außerdem haben diese Personen eine gedämpfte Amplitude im 24 h Aktivitäts-Ruhe-Rhythmus, während Personen ohne Einschlafstörungen eine höhere Stabilität im Alltag zeigen (van Veen et al. 2010).

Untersuchungen, die das Verhalten von ADHS-Patienten*innen mit AHDS-Medikation analysierten, haben gezeigt, dass diese Gruppe geringere relative Amplituden des täglichen Aktivitätsrhythmus, eine schlechtere Schlafeffizienz und eine erhöhte nächtliche Aktivität aufweisen (Kooij et al. 2001; Coogan et al. 2019).

Schlafstörungen bei Personen mit ADHS können zu erheblichen funktionellen Beeinträchtigungen führen, welche sich auf Stimmung, Aufmerksamkeit, Verhalten und dadurch auf die schulische/berufliche Leistung und allgemeine Lebensqualität auswirken können (Wajszilber et al. 2018).

1.3 Dopamin

Substanzen (z.B. Medikation) können die zirkadiane Genexpression verändern und somit auch die Pathophysiologie von Erkrankungen (z.B. neuropsychiatrischen Erkrankungen) beeinflussen (Pezuk et al. 2010). Medikation kann u.a. auf das dopaminerge System wirken und Signalkaskaden, die eine Rolle bei kognitiven Vorgängen spielen, beeinflussen.

Dopamin wirkt im menschlichen Körper als Neurotransmitter im ZNS und als Hormon in der Peripherie. Es gehört zu den Katecholaminen und hat überwiegend eine erregende Wirkung. Verschiedene Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass Dopamin Einfluss auf den zellulären Tag-Nacht-Rhythmus hat. (Hood et al. 2010)

Das Katecholamin wird von dopaminergen Nervenendigungen im ZNS als Neurotransmitter und im Nebennierenmark als Vorstufe von Noradrenalin und Adrenalin produziert. Die Biosynthese erfolgt aus Tyrosin durch die Tyrosin-Hydroxylase zu Dihydroxyphenylalanin (DOPA) und anschließend durch Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase zu Dopamin (Tekin et al. 2014). Die Aktivität dieser Enzyme schwankt in einem zirkadianen Rhythmus (Cahill und Ehret 1981; Huang et al. 2015).

Nach der Synthese wird Dopamin in Vesikeln verpackt durch den VMAT2 (Vesicular Monoamine Transporter) (Eiden und Weihe 2011). Ein Plasmamembranprotein-Dopamin-Transporter (DAT) kontrolliert die intra- und extrazelluläre Dopaminkonzentration (McHugh und Buckley 2015).

Der Abbau von Dopamin im synaptischen Spalt erfolgt durch Catechol-O-Methyltransferase (COMT) und die Monoaminooxidase (MAO) zu Vanillinmandelsäure, welche über den Harn ausgeschieden wird (Roth und Feor 1978; Dauvilliers et al. 2015).

Über das spezifische Binden an Dopaminrezeptoren erfüllt Dopamin verschiedene **physiologische Funktionen** im Organismus. Die Rezeptoren werden in D1- und D2-Rezeptoren eingeteilt, die jeweils weiter in Untergruppen unterteilt. Die beiden Gruppen haben unterschiedliche Funktionen. Die Rezeptoren der D1-Gruppe (D1- und D5-Rezeptoren) aktivieren ein stimulierendes G-Protein, welche über die Adenylatcyklase den cAMP-Spiegel der Zelle erhöht. Die D2-Gruppe (D2-, D3- und D4-Rezeptoren) bewirkt über ein inhibitorisches G-Protein die Verminderung der cAMP-Produktion (Beaulieu et al. 2015).

In der Peripherie ist Dopamin ein Agonist von α - und β -adrenergen Rezeptoren (Farzam et al. 2022) und hat eine sympathomimetische Wirkung (Kelly 1983). In geringer Dosierung (0,5 – 3,0 $\mu\text{g/kg/min}$) erhöht Dopamin die Diurese, die Perfusion im Splanchnikusgebiet und die Natriurese. Bei einer höheren Dosis wirkt Dopamin über β -adrenerge Stimulation eine positiv inotrop und chronotrop, ab 7 $\mu\text{g/kg/min}$ kommt es durch Aktivierung von α -adrenergen Rezeptoren zu einer peripheren und splanchnischen Vasokonstriktion (MacGregor et al. 2000).

Dopamin ist über Signalkaskaden beteiligt bei kognitiven Funktionen, Kontrolle von Bewegungen, Motivation, Erregung und Belohnung (Klein et al. 2019). Außerdem ist es eine der wichtigsten regulatorischen Komponenten der exekutiven Funktion des präfrontalen Kortex, sodass eine Störung des Dopaminhaushalts zu einem eingeschränkten Arbeitsgedächtnis führen kann (Klaus und Pennington 2019).

Darüber hinaus ist eine Fehlfunktion mit der Pathophysiologie vieler psychiatrischer und neurologischer Erkrankungen verknüpft. Bei Schizophrenie wurden hohe Konzentrationen von Dopamin sowie eine höhere Dichte von Dopaminrezeptoren in bestimmten Gehirnregionen festgestellt (Seeman 2013). Bei M. Parkinson-Patienten*innen führt die Degeneration von dopaminergen Neuronen der Substantia nigra zu einer geringeren Dopaminkonzentration, welche die typischen Krankheitssymptome auslöst (Poewe et al. 2017). Auch das sogenannte "Restless-Legs-Syndrom" und ADHS sind mit einer veränderten Dopaminaktivität assoziiert (Volkow et al. 2009; Guo et al. 2017).

In der **Medizin** wird Dopamin als Notfallmedikament eingesetzt und wirkt als Agonist von α - und β -adrenergen Rezeptoren. Typische Indikationen sind Hypotension, Schockzustände und Nierenversagen. Allerdings ist die Verwendung von Dopamin rückläufig. So wird in der S3 Leitlinie „Infarktbedingter kardiogener Schock - Diagnose, Monitoring, Therapie“ der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie aufgrund der erhöhten Sterblichkeit und der Nebenwirkungen vom Einsatz des Katecholamins bei infarktbedingtem kardiogenem Schock abgeraten. (Deutsche Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung e.V. 2019)

Des Weiteren spielt Dopamin indirekt eine Rolle bei der medikamentösen Behandlung des M. Parkinson. Hier wird in der Standardtherapie L-Dopa verabreicht, welches die Blut-Hirn-Schranke passieren kann und am Zielort (Substantia nigra) zu Dopamin umgewandelt wird (LeWitt 2015).

Dopaminantagonisten (z.B. Chlorpromazin, Haloperidol etc.) werden als Antipsychotika und Antiemetika eingesetzt (Hauser et al. 2022; Chokhawala und Stevens 2023).

Auch gängige ADHS-Medikamente (Methylphenidat, Dexamphetamin) wirken unter anderem über das dopaminerge System, indem sie die Dopaminausschüttung erhöhen und die Wiederaufnahme verringern und so die extrazelluläre Dopaminkonzentration im präfrontalen Kortex und im Striatum ansteigen lassen (Del Campo et al. 2011). Gering dosiertes Methylphenidat verändert das Belohnungssystem im Mausmodell durch Inhibition des Dopamintransporters (DAT), dagegen zeigen DAT-Knockout-Mäuse diese Veränderung nicht (Ide et al. 2018).

In verschiedenen Studien wurde bereits gezeigt, dass Dopamin einen **Einfluss auf die zirkadiane Rhythmik** hat. Li et al. zeigten in ihrer Studie an einem 6-Hydroxydopamin-Ratten-Modell für M. Parkinson, dass L-Dopa, also die Vorstufe in der Biosynthese von Dopamin und M. Parkinson-Medikament, für eine Veränderung der Genexpression von zirkadianen Genen im Striatum und im Nucleus suprachiasmaticus sorgt (Li et al. 2017).

Eine Übersichtsarbeit kommt zu dem Ergebnis, dass eine Dopamin-Stimulation, die unter anderem auch bei der medikamentösen Therapie von ADHS eingesetzt wird, wahrscheinlich einen Einfluss auf den Schlaf-Wach-Zyklus und die zirkadiane Rhythmik der Patienten*innen haben. Dadurch kann eine Normalisierung des zirkadianen Rhythmus der extrazellulären Dopamin-Konzentrationen zu einer Verbesserung des Wohlbefindens führen (Mendoza und Challet 2014). Dopamin fördert die Wachheit und reduziert Schlaf (Eban-Rothschild et al. 2018). Außerdem steht Dopamin im Zusammenhang mit zirkadianer Rhythmik und extremer Lichtsensitivität beim zirkadianen Entrainment (Synchronisation der zirkadianen Uhr) (Hirsh et al. 2010).

Klinische, präklinische, bildgebende und genetische Untersuchungen deuten darauf hin, dass Dopamin an der Pathophysiologie der **ADHS** beteiligt ist (Cherkasova et al. 2014). Durch verminderte präsynaptische Synthese, Ausschüttung, Wiederaufnahme, postsynaptische Rezeptordichte, Rezeptoraffinität oder Stoffwechsel liegt bei ADHS-Patienten*innen ein veränderter Dopaminhaushalt vor (Cherkasova et al. 2014). Durch die Verbesserung der Symptome bei Erhöhung der extrazellulären Dopaminspiegel durch Medikation mit Stimulanzien wie Methylphenidat, kann vermutet werden, dass geringe

Dopaminkonzentrationen zumindest teilweise für die Symptome der ADHS verantwortlich sind (Volkow et al. 2005; Huang et al. 2015; Shafiullah und Dhaneshwar 2023). Der veränderte Dopaminhaushalt führt dazu, dass die Signalübertragung zwischen Neuronen verändert abläuft und exekutive Funktionen und Aufmerksamkeit eingeschränkt sind (Faraone 2018).

Bei der Regulation des Dopamin-Haushalts in der Synapse ist der Dopamin Transporter DAT1 beteiligt, indem er Dopamin aus dem synaptischen Spalt in das präsynaptische Neuron transportiert oder in den Extrazellulärraum ausschüttet. Die medikamentöse Behandlung der ADHS durch Stimulanzien blockiert die Funktion des Transporters und erhöht so den Dopaminspiegel (Bonvicini et al. 2016).

ADHS-Patienten*innen haben eine höhere Dichte an Dopamin-Transportern (Spencer et al. 2005). Außerdem zeigt sich eine Korrelation zwischen reduzierter Anzahl an dopaminergen synaptischen Markern und einer unaufmerksamen Symptomatik in der Dopamin-Belohnungs-Signalkaskade (Volkow et al. 2009). In einem ADHS-Tiermodell wurde eine geringe Dopamin-D5-Rezeptordichte im Hippocampus festgestellt (Medin et al. 2013). Gene mit Bezug zum Dopaminhaushalt, die Signalwege und der Dopamin-Metabolismus sind mit der Pathophysiologie der ADHS verknüpft (Barkley et al. 2019).

1.4 Humane dermale Fibroblasten

Änderungen der Genexpression, z.B. durch den Einfluss von Substanzen lassen sich oftmals anhand von Zellkulturmodellen untersuchen. Ein verbreitetes Zellkulturmodell sind humane dermale Fibroblasten (HDF). Diese Zellen befinden sich in der Dermis und sind für die Herstellung von Bindegewebe und Bestandteilen der extrazellulären Matrix (Laminin und Fibronectin) zuständig (Rippa et al. 2019). Damit sorgen HDF für die Verbindung zwischen Epidermis und Dermis sowie zwischen Haut und Faszien und spielen eine entscheidende Rolle bei der Wundheilung (Abbasi et al. 2020).

Auch periphere Zellen haben eine **zirkadiane Rhythmik**. Diese zeigt sich in einer Veränderung der Genexpression zirkadianer Gene im Laufe von ca. 24 h. Yang et al. haben zum Beispiel eine veränderte Expression der Gene *DEC2* und *DBP* und eine reduzierte Amplitude der rhythmischen Expression von *BMAL1*, *REV-ERB α* und *DBP* bei Fibroblastenkulturen von Patienten*innen mit einer bipolaren Persönlichkeitsstörung beobachtet (Yang et al. 2009).

Die meisten Zellen außerhalb des Nucleus suprachiasmaticus verlieren ihren zirkadianen Rhythmus *in vitro*. HDF oszillieren jedoch stabil und unabhängig ohne Dämpfung der Amplitude der Genexpression. Allerdings beschränkt sich dieser konstante Rhythmus nur auf die einzelnen Zellen, in einer Zellkultur sind sie funktionell nicht miteinander gekoppelt, sodass für Untersuchungen der Genexpression eine Synchronisation notwendig ist (Welsh et al. 2004).

Humane dermale Fibroblasten zeigen Unterschiede der zirkadianen Genexpression von *Per2* und *Cry1* zwischen ADHS-Patienten*innen und gesunden Probanden*innen bzw. ADHS-Patienten*innen mit Medikation (Coogan et al. 2019). Es wurde nachgewiesen, dass die Oszillation in HDF-Kulturen identisch sind mit denen von SCN-Neuronen (Yagita et al. 2001). HDF stellen ein nützliches Modell zur Untersuchung der zirkadianen Rhythmik dar und geben die Möglichkeit, den Einfluss von Medikamenten oder anderen Substanzen auf die Genexpression zu untersuchen, da individuelle Spendereigenschaften (Chronotyp etc.) bestehen bleiben und in der Genexpression abgebildet werden und eine molekulare Ähnlichkeit zu Zellen des zentralen Nervensystems besteht. (Nagoshi et al. 2004; Pagani et al. 2010; Kálmán et al. 2016; Faltraco et al. 2023).

Dopamin hat außerdem **Einfluss auf den Zellzyklus** und das Zellwachstum. Der Zellzyklus besteht aus der Mitose- und Interphase. In der Mitosephase findet die Zellkernteilung statt. Die Interphase wird weiter unterteilt in G1-, S- und G2-Phase (Wang 2022). Die G1-Phase ist durch Zellwachstum sowie Synthese von mRNA und Proteinen gekennzeichnet, die S-Phase durch DNA-Replikation und in der G2-Phase finden wieder Zellwachstum und Proteinsynthese statt. Nach der Zellteilung ist auch ein Übertritt in die G0-Phase möglich, in der die Zellen ruhen und keine weitere Zellteilung stattfindet. Eine Rückkehr in die G1-Phase ist möglich (Vermeulen et al. 2003; Buttlar et al. 2020).

In einer Studie zur neostriatalen Neurogenese in der lateralen ganglionären Eminenz zeigte sich, dass diese Entwicklungsprozesse in einem dopaminreichen Milieu stattfinden. Die Aktivierung von D1-Rezeptoren verringert den Eintritt von Vorläuferzellen von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus, während die Aktivierung von D2-Rezeptoren den Übergang von G1- in die S-Phase fördert. D1-ähnliche Effekte sind in der ventrikulären Zone und D2-ähnliche Effekte in der subventrikulären Zone ausgeprägt. Die Gesamtwirkungen von Dopamin auf den Zellzyklus sind D1-ähnliche Wirkungen, was höchstwahrscheinlich auf das Überwiegen von D1-ähnlichen Bindungsstellen im embryonalen Neostriatum zurückzuführen ist (Ohtani et al. 2003). Über inhibitorische Effekte auf die Ribonukleotidreduktase, ein wichtiges Enzym der Zellreplikation, inhibiert Dopamin das Zellwachstum und den Zellzyklus in der frühen S-

Phase (Woldman et al. 2005). Eine weitere Studie konnte übereinstimmend zeigen, dass Dopamin die DNA-Synthese in embryonalen Stammzellen von Mäusen über cAMP-, Ca(2+)/Proteinkinase C-, MAPK- und NF-κB-Signalwege hemmt (Lee et al. 2006).

1.5 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Eine gestörte zirkadiane Rhythmik kann die Symptome von ADHS-Patienten*innen verstärken und deren Lebensqualität stark einschränken. Da Dopamin eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie der ADHS spielt, Teil des Wirkmechanismus von ADHS-Medikamenten ist und Einfluss auf die zirkadiane Rhythmik hat, wurde dieser Neurotransmitter in der vorliegenden Arbeit untersucht. Hierzu wurde im humanen dermalen Fibroblastenmodell von Studienteilnehmern*innen mit einer ADHS-Diagnose und Kontrollpersonen analysiert, wie verschiedene Dopaminkonzentrationen die Expression von zentralen zirkadianen Genen beeinflussen.

2 Methoden und Materialien

2.1 Liste der verwendeten Materialien

Zur Durchführung der Versuche wurden folgende Chemikalien, Hilfsmittel und andere Materialien verwendet, die tabellarisch dargestellt wurden:

Tabelle 2: Zellkulturmedien und -lösungen

Bezeichnung	Hersteller
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco, Thermo Fisher, UK
FBS (Fetal Bovine Serum)	Gibco, Thermo Fisher, UK
Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x	Gibco, Thermo Fisher, UK
Recovery Cell Culture Freezing Medium DMSO 10%	Gibco, Thermo Fisher, UK
Penicillin-Streptomycin (10 000 U/ml)	Gibco, Thermo Fisher, UK
0,05 % Trypsin-EDTA 1x	Gibco, Thermo Fisher, UK
Trypan Blue Stain 0,4 %	Gibco, Thermo Fisher, UK
Dopamin Fresenius 50 g/5 ml	Fresenius Kabi, DE
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, DE

Zusammensetzung Nährmedium:

DMEM versetzt mit 100 units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % FBS

Tabelle 3: Chemikalien und Kits für die RNA-Isolation, cDNA-Synthese und qRT-PCR

Bezeichnung	Hersteller
Guanidinthiocyanat	Roth, DE
Natrium-N-Lauroylsarkosinat	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, DE
Natriumcitrat	Roth, DE
Betamercaptoethanol	Roth, DE
PerfeCTa MasterMix	Quantabio, US
Kapa Sybr Fast qPCR Mastermix Universal	KapaBiosystems, US
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, DE
SuperScript III, CellsDirect cDNA Synthesis Kit	Invitrogen, Thermo Fisher, US
Ethanol ≥ 99,5 %, Ph.Eur., reinst	Roth, DE

Zusammensetzung RNA-Lyse-Puffer:

4,5 M Guanidiniumthiocyanat, 0,5 % Natrium-N-Lauroylsarkosinat, 25 mM Natriumcitrat, 0,1 M Betamercaptoethanol

Tabelle 4: qRT-PCR-Oligonukleotide

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
<i>Rpl13a</i>	GCCAGAAATGTTGATGCCTT	AGATGGCGGAGGTGCAG
<i>Rpl19a</i>	GTGGCAAGAAGAAGGTCTGG	GCCCATCTTTGATGAGCTTC
<i>Gapdh</i>	GAAGGTGAAGGTCGGAGT	GAAGATGGTGATGGGATTTC
<i>Clock</i>	CCAGCAGTTTCATGAGATGC	GAGGTCATTTTCATAGCTGAGC
<i>Bmal1</i>	AAGGATGGCTGTTTCAGCACATGA	CAAAAATCCATCTGCTGCCCTG
<i>Cry1</i>	CACGAATCACAAACAGACGG	TACATCCTGGACCCCTGGT
<i>Per1</i>	TGGGGACAACAGAACAGAGAA	AGGACACTCCTGCGACCA
<i>Per2</i>	GTATCCATTCATGCTGGGCT	TCGTTTGAAGTGGGCTGAC
<i>Per3</i>	TCAGTGTTTGGTGAAGGAA	TCTGGGTCAGCAGCTCTACA

Alle Primer wurden bei der Firma Eurofins (Alameda, US) bestellt.

Tabelle 5: Sonstige Materialien (Geräte)

Bezeichnung	Name	Hersteller
6-Well-Zellkulturplatten	CellStar 6-Well Multiwellplatten für Zellkulturen, Polystyrol	Greiner Bio-One, AT
12-Well-Zellkulturplatten	CellStar 12-Well Multiwellplatten	Greiner Bio-One, AT
Biopsiestanze	Biopsy Punch 2 mm/3 mm	Stiefel, US
Dispergierer (Sonicator)	Ultra-Turrax T10 Basic S1 Homogenizer System	IKA Werke, DE
Echtzeit-PCR-Gerät	CFX Connect Real-Time PCR Detection System (qRT-PCR)	Bio-Rad, US
Eppendorfgefäße (2 ml)	Safe-Lock Tubes	Eppendorf, DE
Kryogefäße	2,0 ml Cryovial	Simport Scientific, CA
Mikroplatte für Spektrophotometrie	µDrop Plate	Thermo Scientific, UK
PCR-Gefäße (0,2 ml)	Ultra Tubes 0,2 ml	Sorenson Bioscience, US
PCR-Platten	PCR Plate, 96-well, low profile, non-skirted	Thermo Scientific, UK
Pflaster (mit Lokalanästhetikum)	Emla Pflaster	Aspen, DE
Spektrophotometer	Multiskan GO	Thermo Scientific, UK
Thermocycler	Mastercycler pro	Eppendorf, DE

Zählkammer	C-Chip Disposable Hemocytometer (2 tests, Neubauer Improved)	NanoEntek, KR
Zellkulturflaschen 25 cm ²	Nunc EasYFlask Zellkulturkolben	Thermo Scientific, UK
Zellkulturschalen (Petrischalen)	Tissue Culture Dish (35 mm)	Thermo Scientific, UK
Zellschaber	Cell Scraper	Corning, US

2.2 Einschluss der Studienteilnehmer*innen und psychometrische Testverfahren

Die Durchführung der Studie wurde durch die Ethik-Kommission der Universität Rostock genehmigt. (Registriernummer A2013-159) Von jedem Studienteilnehmer wurde vorab das schriftliche Einverständnis gegeben. Die Studienbedingungen entsprachen den Richtlinien der Deklaration von Helsinki.

Für die Untersuchungen wurden humane dermale Fibroblasten (HDF) von Studienteilnehmer*innen mit einer ADHS-Diagnose und von Kontrollpersonen ohne neuropsychiatrische Erkrankungen verwendet, die nach Geschlecht und Alter passend ausgewählt wurden. Die Studienteilnehmenden wurden durch die Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universitätsmedizin Rostock rekrutiert. Die Diagnostizierung einer ADHS-Erkrankung erfolgte durch auf diesem Gebiet erfahrene Psychiater*innen. Für die Biopsien wurden ausschließlich Erwachsene (Alter > 18 Jahre) ausgewählt. Als Kontrollen wurden nur Probanden*innen untersucht, die weder in der Kindheit noch im Erwachsenenalter von ADHS betroffen waren. Personen in Schichtarbeit, Schwangere und in der Stillzeit befindende Personen wurden ausgeschlossen. Eingeschlossen wurden Probanden*innen, bei denen keine weiteren neuropsychiatrischen Erkrankungen (akut oder in der Vergangenheit) bekannt waren, die stärker ausgeprägt waren als ADHS.

Das ADHS-Screening wurde anhand der WURS-k (Wender-Utah-Rating-Scale) durchgeführt. Die Einordnung der Symptome erfolgte mittels Kriterien nach DSM-IV und ICD-10. Zusätzlich wurden folgende psychometrische Tests durchgeführt: SKID-I und -II (Strukturiertes Klinisches Interview nach DSM-IV), DIVA 2.0 (Diagnostisches Interview für ADHS bei Erwachsenen), CAARS (Conners ADHD Rating Scales) und PSQI (Pittsburgh Sleep Quality Index).

Der Intelligenzquotient wurde durch den MWT (Mehrfachwahl-Wortschatz-Intelligenztest) und der Chronotyp der Probanden*innen durch den D-MEQ (Morningness-Eveningness-Questionnaire, deutsche Version) ermittelt.

2.3 Kultivierung humaner dermaler Fibroblasten

Grundlage für die Kultivierung humaner dermaler Fibroblasten war das Protokoll von Takashima (Takashima 2001). Ein Emla Pflaster (mit Lidocain und Procain) wurde zur Lokalanästhesie 1 h vor der Biopsie auf den Oberarm geklebt. Nach der gründlichen Reinigung der Haut mit einem wässrigen Hautantiseptikum (Octenisept, Schülke, DE) wurde den Probanden*innen mittels Hautstanzbiopsie ein Biopsat (Durchmesser ca. 3 mm) von darin erfahrenen Mediziner*innen entnommen.

Das Biopsat wurde in eine Petrischale mit 2 ml 1xPBS überführt und gewaschen. Anschließend wurde der Waschpuffer entfernt und 2 ml des Digestions-Mediums (enthält Liberase = Collagenase I und II) zugegeben, um die Epidermis zu entfernen und die Kontamination der Zellkultur mit anderen Zellen zu verhindern. Darauf folgte eine dreistündige Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank.

Nach der Inkubation wurde die Probe mit 1xPBS gewaschen. Der Waschpuffer wurde anschließend entfernt und 10 µl 1xPBS zur Probe gegeben, so dass das Biopsat für die folgenden Schritte leicht angefeuchtet blieb. Nun konnte die Probe mit einem Skalpell in kleine Quadrate geschnitten werden, damit die Fibroblasten aus den scharf geschnittenen Kanten des Gewebes heraus auf der Oberfläche der Petrischale anwachsen konnten.

Anschließend wurde ein steriles rundes Deckgläschen und darüber wiederum ein quadratisches Deckgläschen platziert, um das Biopsat in direktem Kontakt auf der Oberfläche zu halten. Ca. 2 ml des Kulturmediums (DMEM mit 20 % FBS und 1/100 Antibiotikum) wurden dazu gegeben. Die Inkubation im Brutschrank erfolgte für 3 bis 4 Tage. (37,5 °C, 5 % CO₂).

Das Medium wurde alle drei bis vier Tage gegen 2 ml frisches Kulturmedium (DMEM, 20 % FBS, 1/100 Antibiotikum) ausgetauscht. Nach ca. 10 Tagen (abhängig von der Konfluenz der Fibroblastenkultur) konnte das Kulturmedium gegen ein Medium mit 1/100 AB, aber nur 5 % FBS gewechselt werden.

Sobald eine Zellkultur konfluent ist, also die Oberfläche eines Kulturgefäßes vollständig von Zellen bewachsen ist, wird die Proliferation der Fibroblasten durch Kontaktinhibition beendet.

Aus diesem Grund war es notwendig, die Zellen aus der Petrischale durch eine Passage in mehrere Gefäße aufzuteilen. Meist wurde dazu die Zellkultur zuerst von der Petrischale in eine 6-Well-Platte passagiert und sobald sich hier wieder eine Konfluenz der Zellen zeigte, von dort aus in 25 cm²-Zellkulturflaschen. In diesen wurden die Zellen so lange kultiviert, bis sie ebenfalls konfluent und damit bereit für das folgende 28 h-Experiment waren.

2.4 Passagieren der Zellen

Für eine Passage wurden die Zellen zweimal mit 2 ml 1xPBS gewaschen. Nach Entfernung des Waschpuffers wurden 300 µl Trypsin/EDTA-Lösung hinzugegeben und ca. fünf Minuten bei 37 °C (dem Temperaturoptimum von Trypsin) inkubiert. Das vorherige Waschen ist notwendig, da das im Medium enthaltene FBS die effektive Wirkung von Trypsin einschränkt.

Trypsin ist ein vom Pankreas sezerniertes Verdauungsenzym mit proteolytischer Wirkung. In Zellkulturen wird es verwendet, um adhärente Zellen durch Spaltung extrazellulärer Proteine von der Oberfläche des Kulturgefäßes zu lösen.

Nach der Inkubation mit Trypsin wurde unter dem Mikroskop kontrolliert, ob die Zellen eine kugelige Form angenommen haben bzw. von der Gefäßoberfläche abgelöst sind. Noch adhärente Zellen wurden mit einem Zellschaber gelöst.

Zur Inaktivierung von Trypsin wurde 1 ml Zellkulturmedium (DMEM + 5 % FBS + 1/100 Antibiotikum) hinzugegeben und mit den Zellen gemischt. Die entstandene Suspension wurde dann in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß umgefüllt und für 10 min bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Durch die Zentrifugation entstand ein Zellpellet, dessen Überstand mit einer Pipette abgenommen wurde. Anschließend wurde frisches Medium hinzugefügt und das Zellpellet resuspendiert.

Um die Zellen in ein neues Gefäß zu überführen, wurden Petrischalen/6-Well-Platten/25 cm²-Kulturflaschen mit frischem Medium vorbereitet. Von der Zell-Suspension wurden jeweils 10 µl (6-Well-Platte/Kulturflasche) bzw. 5 µl (Petrischale) in das vorbereitete Gefäß gegeben.

Außerdem wurden bei jeder Passage auch zwei Kryogefäße mit einer Zell-Suspension gefüllt, die bei -80 °C über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden können. Hierzu wurde zum verbliebenen Rest der Suspension 1 ml Recovery-Freezing-Medium gegeben und invertiert. Anschließend wurden jeweils 0,5 ml des Gemisches auf die Kryogefäße aufgeteilt.

2.5 Kontrolle der Viabilität der Zellen

Die Viabilität der Fibroblasten bei unterschiedlichen Dopaminkonzentrationen wurde an 3 Zellkulturen von ADHS-Patienten*innen überprüft. Die Zellviabilität beschreibt den Anteil lebender Zellen in einer Zellkultur. Basierend auf der zur Verfügung stehenden Literatur wurden die Konzentrationen 0,1 μM , 1 μM , 10 μM und 100 μM Dopamin für den Viabilitätstest ausgewählt.

Konfluente Kulturen wurden mit den entsprechenden Dopaminkonzentrationen im Kulturmedium (DMEM, 5 % FBS) inkubiert. Nach 24 h Inkubation wurde das Medium entfernt und zweimal mit 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden jeweils 500 μl Trypsin dazugegeben und die Proben für 5 min in den Brutschrank gelegt. Nach Inkubation wurde 1 ml Kulturmedium mit 5 % FBS dazugegeben, um die Wirkung von Trypsin zu beenden. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 1200 rpm.

Der entstandene Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 1 ml 1xPBS suspendiert. Im Verhältnis 1:1 wurde die Suspension mit Trypanblau gemischt (jeweils 10 μl) und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. 10 μl des Gemisches wurden in eine Einweg-Zählkammer (C-Chip Disposable Hemocytometer – Neubauer improved, Nano EnTek) pipettiert und anschließend unter dem Mikroskop ausgewertet.

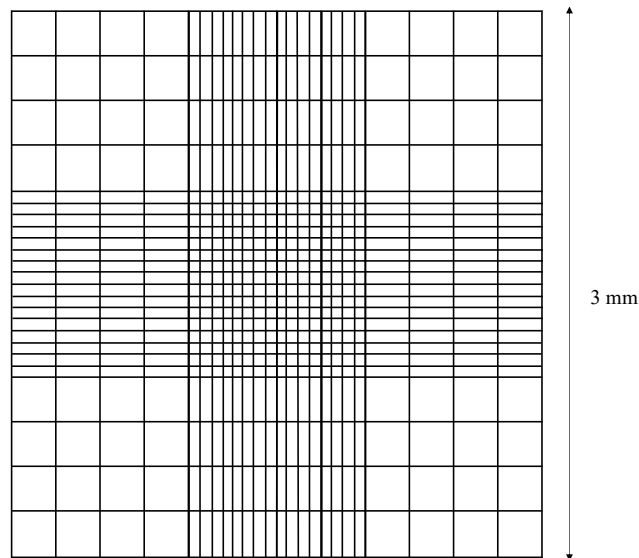


Abbildung 1: Zählkammer Neubauer improved, eigene Darstellung nach NanoEnTek

Zum Zählen der Zellen wurden die 1 mm² großen Quadrate in den Ecken verwendet. Trypanblau färbt tote Zellen an, da der Farbstoff durch die geschädigte Zellmembran eindringen kann. Lebende, intakte Zellen sind demnach ungefärbt bzw. erscheinen weiß vor

dem blauen Hintergrund. Es wurden jeweils alle Zellen gezählt, die sich innerhalb des Quadrates befanden, sowie die, die jeweils auf der unteren oder der rechten Linie platziert waren. In der 100 µm tiefen Zählkammer entspricht jedes Quadrat 0,0001 ml Volumen. Die Anzahl der Zellen in 1 ml Suspension wurde nach folgender Formel berechnet:

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

Die Viabilität der Zellen wurde berechnet:

$$\text{Viabilität} = \frac{\text{lebende Zellen}}{\text{Gesamtzahl der Zellen}} \times 100 \%$$

2.6 Untersuchung des Zellwachstums

Um den Einfluss von Dopamin auf die Proliferation der humanen dermalen Fibroblasten (HDF) zu untersuchen, wurde das gleiche Verfahren wie beim Viabilitätstest angewendet. Hierbei wurde das Zellpellet in 0,5 ml statt 1 ml suspendiert. Bei einer geschätzten Konfluenz von ca. 80 % wurde in einem Well der Viabilitätstest durchgeführt (Zeitpunkt 0 h). Anschließend wurden 3 Wells einer 6-Well-Platte mit den folgenden Dopamin-Konzentrationen in DMEM mit 5 % FBS für 24 h inkubiert: 0 µM, 1 µM, 10 µM. Am darauffolgenden Tag wurde für diese Zellkulturen ebenfalls ein Viabilitätstest durchgeführt und die Anzahl der Zellen je 0,5 ml PBS mit dem Vortag sowie untereinander verglichen.

2.7 Synchronisation der Zellen und 28 h-Experiment

Zur Vorbereitung für das 28 h-Experiment wurde die konfluente primäre Zellkultur in 8 Kulturflaschen (ZT0 – ZT28, Probenentnahme alle 4 h) passagiert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden diese Kulturen mit einem Medium mit der ausgewählten Dopaminkonzentration behandelt und 24 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen entfernt und diese zweimal mit 1xPBS gewaschen. Es wurde jeweils 1 ml Induktionsmedium (100 nM Dexamethason in DMEM) dazu pipettiert. Darauf folgte die Inkubation für 15 min bei 37 °C. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Medium dann wieder entfernt und die Proben zweimal gewaschen. Frisches Medium wurde für die Proben ZT4 bis ZT28 dazugegeben. Für den ZT0 erfolgte 30 min nach Synchronisation mit Dexamethason die Probenentnahme.

Alle 4 h erfolgte die Probenentnahme, d.h. zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die entsprechenden Kulturen gewaschen (1xPBS) und anschließend 0,5 ml RNA-Lyse-Puffer

dazugegeben. Die erhaltene Suspension wurde dann in ein Eppendorf-Gefäß mit 10 µl Beta-Mercaptoethanol (reduziert Disulfidbrücken und inaktiviert dadurch RNasen) überführt. Die Proben wurden für 1 min homogenisiert und bei -80 °C bis zur RNA-Isolierung gelagert. Dieser Vorgang wiederholte sich, bis der Zeitpunkt ZT28 erreicht wurde.

2.8 RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation wurde das RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) verwendet. Die Durchführung erfolgte wie vom Hersteller beschrieben. Die Lysate (ca. 500 µl Volumen) wurden mit einem Dispergierer homogenisiert und in einer gDNA Eliminator Spin Säule zentrifugiert (1 min, 10000 rpm), um genomische DNA zu eliminieren. Die erhaltene Flüssigkeit im Auffang-Gefäß wurde dann gemessen (ca. 500 µl) und mit einer 70 %-Ethanol-Lösung im Verhältnis 1:1 gemischt. Dann wurde die Lösung in einer RNA Spin Säule für 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Diese Säule enthält eine Silikondioxid-Membran, die RNA aus lysierten Zellen spezifisch bindet.

Der Durchfluss wurde jeweils verworfen und 700 µl des Waschpuffers RW1 in die Säule pipettiert. Dieser enthält Guanidin-Salz und Ethanol und entfernt Moleküle, die nicht spezifisch auf der Membran gebunden sind. Noch einmal erfolgte eine Zentrifugation für 1 min bei 10000 rpm. Danach folgten zwei weitere Waschschrte mit jeweils 500 µl des Waschpuffers RPE. Dieser entfernt Spuren von Salzen vorheriger Puffer.

Nachdem die Säule in einem neuen Auffang-Gefäß platziert wurde, folgte zur Trocknung der Membran eine Zentrifugation für eine Minute bei 12000 rpm. Um die RNA aus der Membran zu lösen wurden, je nach Menge des ursprünglichen Lysats, 8-13µl RNase-freies Wasser zentral auf die Membran pipettiert und vor der nächsten Zentrifugation für ca. 5 min inkubiert. In einem neuen Eppendorf-Gefäß wurden die RNA Spin Säulen für 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert und das RNA-Eluat bei -80 °C gelagert.

Um den RNA-Gehalt der jeweiligen Proben zu ermitteln, wurde mittels Spektrophotometrie die jeweilige Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen und mit Hilfe einer zuvor angelegten Standardkurve die RNA-Konzentration berechnet. Die Grundlage dieser Berechnung ist das Lambert-Beer-Gesetz.

$$E_{\lambda,T} = \varepsilon_{\lambda,T} \cdot c \cdot d$$

$$c = \frac{E_{\lambda,T}}{\varepsilon_{\lambda,T} \cdot d}$$

Dabei ist $E_{\lambda,T}$ die Extinktion, $\varepsilon_{\lambda,T}$ der Extinktionskoeffizient, c die Konzentration und d die Schichtdicke der Messküvette (1 cm).

RNA und DNA weist ein Absorptionsmaximum im UV-Bereich bei 260 nm auf. Proteine haben dieses bei 280 nm, so dass durch diese Wellenlänge die Reinheit der Probe überprüft werden kann. Es wurden alle Proben mit einem Quotienten A260/A280 zwischen 1,8 und 2,3 als ausreichend rein betrachtet und zur Reversen Transkription weiterverwendet.

2.9 Reverse Transkription / Erststrang-cDNA-Synthese

Um von der isolierten RNA die komplementäre DNA (complementary DNA, cDNA) zu erhalten, wurde eine Reverse Transkription mithilfe des SuperScript III Cells direct Kit (Invitrogen) durchgeführt. (Details zu den einzelnen Bestandteilen sind im Anhang aufgeführt.) Dazu wurden die Konzentrationen der RNA-Proben mittels Spektrophotometrie ermittelt und diese dann entsprechend auf eine Zielkonzentration von 1 µg/µl mit RNase-freiem Wasser verdünnt (Endvolumen 2,5 µl). Eine Negativkontrolle mit 2,5 µl Wasser wurde zusätzlich angelegt.

Anschließend wurde der Mix 1 vorbereitet, der je RNA-Probe 0,6 µl Oligo(dT)₂₀ (50 µM) und 0,3 µl 10 mM dNTP-Mix enthielt. Von dieser Mischung wurden dann zu jeder Probe 0,9 µl gegeben und gut durchgemischt. Dann wurden die Proben im vorgeheizten Thermocycler für 5 min bei 70 °C inkubiert. In dieser Zeit wurde der Mix 2 vorbereitet, bestehend aus: 1,8 µl 5X RT-Puffer, 0,3 µl RNaseOUT (40 U/µl), 0,3 µl SuperScript III RT (200 U/µl) und 0,3 µl 0.1 M DTT je Probe. Davon wurden 2,7 µl zu jeder Probe gegeben. Für die Negativkontrolle wurden die einzelnen Komponenten direkt dazu gegeben und SuperScriptTM III RT wurde durch 0,3 µl steriles, destilliertes Wasser ersetzt.

Im Anschluss erfolgte eine erneute Inkubation im Thermocycler für 50 min bei 50 °C. Durch die folgende Erhitzung für 5 min bei 85 °C wurde die Reaktion inaktiviert. Um die übrige RNA zu entfernen, wurden zu jeder Probe 0,3 µl RNase H (2 U/µl) gegeben und die Proben anschließend bei 37 °C für 20 min inkubiert. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.10 Quantitative Real-Time PCR

Zur Analyse der Genexpression wurde die quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) genutzt. Das Prinzip dieses Verfahrens basiert auf der Polymerase-Kettenreaktion

(PCR), bei der DNA durch die zyklische Wiederholung der drei Schritte Denaturierung, Anlagerung der Primer und Elongation durch DNA-Polymerasen vervielfältigt wird. Bei der qRT-PCR kann die DNA-Vervielfältigung in Echtzeit erfasst werden. Dazu werden DNA-Sonden verwendet, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Diese binden an komplementäre Abschnitte der DNA-Stränge, und geben nach Abbau durch die Polymerase und Anregung mit Licht ein Fluoreszenzsignal ab, das nach jedem Amplifikationszyklus (proportional zur DNA-Menge) stärker wird, da mehr DNA-Sonden binden können. Dieses Fluoreszenzsignal wird in Echtzeit detektiert und kann später als Schmelzkurve dargestellt werden.

Untersucht wurden die zirkadianen Gene: *Clock*, *Bmal1*, *Cry1*, *Per1*, *Per2* und *Per3*. Als Referenz wurden die konstitutiv exprimierten Gene (Housekeeping Genes) *Rpl13A*, *Rpl19A* sowie *GAPDH* genutzt.

Auf einer PCR-Platte (96-Well-Platte) wurden alle Zeitpunkte einer Probe (ZT0 - ZT28) für ein Gen als Duplikat untersucht (2 Replikate pro Zeitpunkt). Außerdem wurde für das jeweilige Gen eine Negativkontrolle (Wasser statt cDNA) als Duplikat auf der Platte platziert.

	1	2	3	4	5	6
A	HDF-K07 0 μ M 0 h <i>Rpl13A</i>	HDF-K07 0 μ M 0 h <i>Rpl13A</i>	HDF-K07 0 μ M 0 h <i>Bmal1</i>	HDF-K07 0 μ M 0 h <i>Bmal1</i>	Negativ- Kontrolle <i>Rpl13A</i>	Negativ- Kontrolle <i>Rpl13A</i>
B	HDF-K07 0 μ M 4 h <i>Rpl13A</i>	HDF-K07 0 μ M 4 h <i>Rpl13A</i>	HDF-K07 0 μ M 4 h <i>Bmal1</i>	HDF-K07 0 μ M 4 h <i>Bmal1</i>	Negativ- Kontrolle <i>Bmal1</i>	Negativ- Kontrolle <i>Bmal1</i>
C	HDF-K07 0 μ M 8 h <i>Rpl13A</i>	HDF-K07 0 μ M 8 h <i>Rpl13A</i>	HDF-K07 0 μ M 8 h <i>Bmal1</i>	HDF-K07 0 μ M 8 h <i>Bmal1</i>		
D	HDF-K07 0 μ M 12 h <i>Rpl13A</i>	HDF-K07 0 μ M 12 h <i>Rpl13A</i>	HDF-K07 0 μ M 12 h <i>Bmal1</i>	HDF-K07 0 μ M 12 h <i>Bmal1</i>		
E	HDF-K07 0 μ M 16h <i>Rpl13A</i>	HDF-K07 0 μ M 16h <i>Rpl13A</i>	HDF-K07 0 μ M 16h <i>Bmal1</i>	HDF-K07 0 μ M 16h <i>Bmal1</i>		
F	HDF-K07 0 μ M 20 h <i>Rpl13A</i>	HDF-K07 0 μ M 20 h <i>Rpl13A</i>	HDF-K07 0 μ M 20 h <i>Bmal1</i>	HDF-K07 0 μ M 20 h <i>Bmal1</i>		
G	HDF-K07 0 μ M 24 h <i>Rpl13A</i>	HDF-K07 0 μ M 24 h <i>Rpl13A</i>	HDF-K07 0 μ M 24 h <i>Bmal1</i>	HDF-K07 0 μ M 24 h <i>Bmal1</i>		
H	HDF-K07 0 μ M 28 h <i>Rpl13A</i>	HDF-K07 0 μ M 28 h <i>Rpl13A</i>	HDF-K07 0 μ M 28 h <i>Bmal1</i>	HDF-K07 0 μ M 28 h <i>Bmal1</i>		

Abbildung 2: Plattenbelegung am Beispiel HDF-K07 0 μ M Dopamin für *Rpl13A* und *Bmal1*

Zur Vorbereitung einer jeden qRT-PCR wurde die cDNA im Verhältnis 1:20 mit sterilem, doppelt destilliertem Wasser verdünnt. Je Probe wurden 10 μ l Master Mix (enthält u.a. DNA-Polymerase, dNTPs und Fluoreszenzfarbstoff) mit 1 μ l Primer forward und 1 μ l Primer reverse für das jeweilige Zielgen gemischt. Abhängig von der Anzahl der zu analysierenden Proben wird ein Vielfaches der Mengen zunächst zusammen in einem Eppendorf-Gefäß vermischt, bevor jeweils 12 μ l der Master Mix Primer (MMP)-Lösung in PCR-Gefäße

gegeben wird. In diese werden anschließend 8 µl der verdünnten cDNA hinzugefügt, für die Negativkontrollen 8 µl doppelt destilliertes Wasser statt der cDNA.

Der Inhalt der PCR-Gefäße (20 µl) wurde jeweils in zwei separate Wells der 96er-PCR-Platte aufgeteilt (je 10 µl). Im Mini-Plate Spinner wurden die Platten kurz zentrifugiert. Die Platte wurde im CFX Connect Real-Time PCR Detection System eingesetzt. Über die Software wurden die Wells beschriftet und die zu untersuchenden Gene ausgewählt. Das Protokoll „Kapa Sybr Fast“ wurde ausgewählt und das Programm gestartet. Folgende Schritte wurden immer wieder durchlaufen und die Fluoreszenz der DNA-Sonden gemessen:

3 min 95 °C (Aktivierung DNA-Polymerase) - 1 Zyklus

3 s 95 °C (Denaturierung) - 40 Zyklen

20 s 60 °C (Anlagerung der Primer) - 40 Zyklen

Am Ende des Programms wurden die Schmelzkurven, Schmelztemperaturen und Threshold Cycle (C_T -Werte) angezeigt. Anhand der Kurven wurde überprüft, ob einzelne Messwerte stark abweichen und ob die Negativkontrolle eine Nulllinie darstellt. Die folgenden Darstellungen sind beispielhaft für die verschiedenen Kurven im Computerprogramm (siehe Abbildungen 3-5). Hier wurde die qRT-PCR für *Clock* mit der Probe HDF-P12 1 µM und 10 µM Dopamin (ZT0 - ZT28) durchgeführt. Die einzelnen Kurven liegen nah beieinander, die Negativkontrolle wurde ausgeblendet.

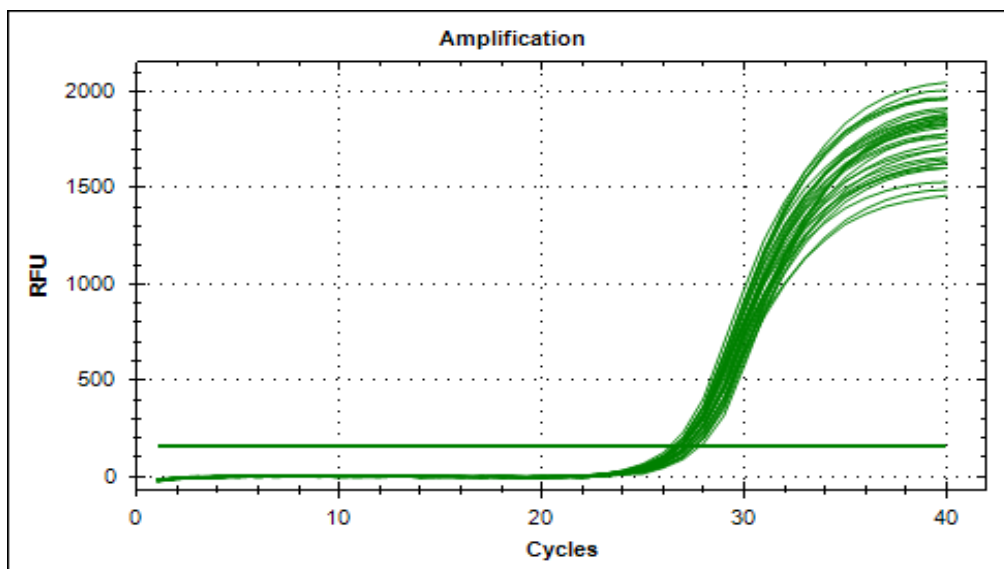


Abbildung 3: Amplifikationskurve von *Clock* bei HDF-P12 mit 1 und 10 µM Dopamin (RFU = Relative Fluoreszenzeinheiten)

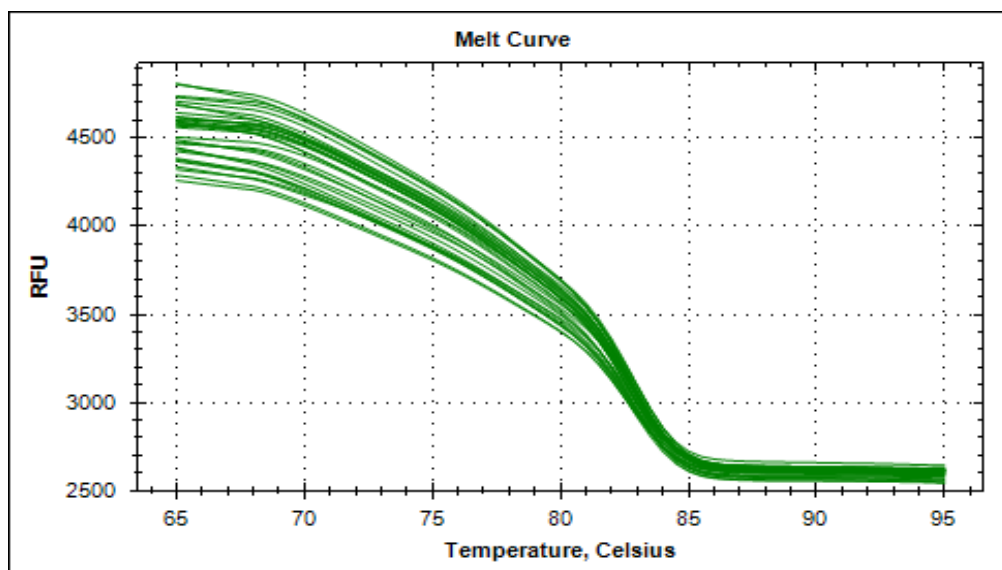


Abbildung 4: Schmelzkurve von Clock bei HDF-P12 mit 1 und 10 μM Dopamin

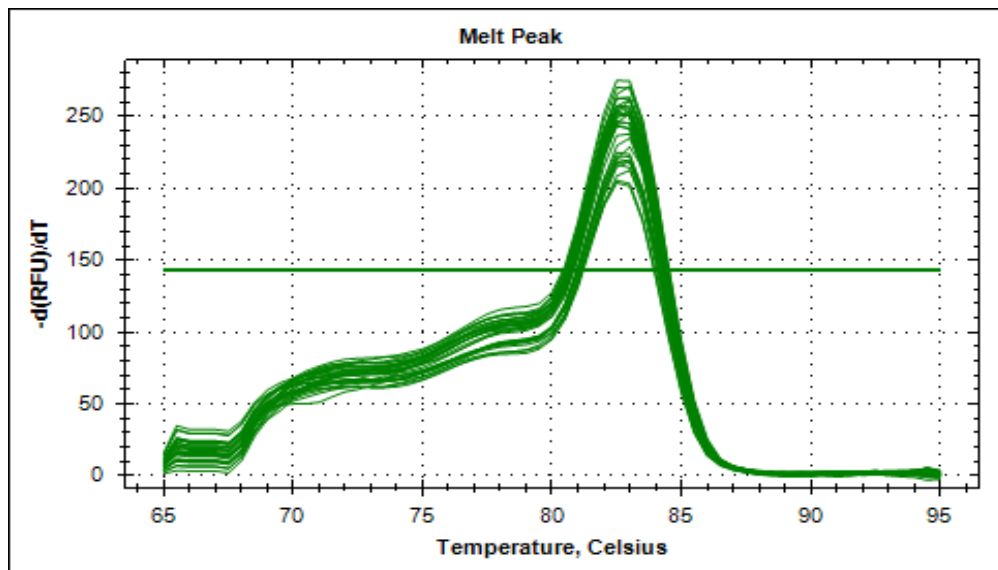


Abbildung 5: Schmelzpeak von Clock bei HDF-P12 mit 1 und 10 μM Dopamin

Bei der angewandten $2^{-\Delta\text{C}_T}$ - **Methode** (Livak und Schmittgen 2001) erfolgt zur Auswertung der Daten keine absolute Quantifizierung, sondern die Darstellung der Anzahl der zirkadianen Gene relativ zur Expression von Housekeeping-Genen. Diese Gene werden konstant exprimiert, wodurch überprüft werden kann, ob die Menge der cDNA bei allen Proben gleich ist. Der C_T -Wert gibt an, ab welchem Amplifikationszyklus die Fluoreszenz erstmals signifikant höher ist als die Hintergrund-Fluoreszenz.

Jede Probe wurde als Duplikat untersucht. War die Standardabweichung der C_T -Werte zwischen den beiden Duplikaten größer als 0,5, wurde der Versuch wiederholt. Die Negativkontrolle sollte in der Darstellung der Schmelzkurve einen geraden Verlauf in Nähe der Nulllinie aufweisen. Außerdem wurde zur Validierung der PCR-Produkt-Spezifität die Schmelztemperatur herangezogen. Das ist die Temperatur, bei der 50 % der doppelsträngigen DNA denaturiert ist. Diese sollte relativ konstant sein und maximal um 1 °C schwanken, pro Gen dürfte also nur ein Schmelzpeak bei allen Proben sichtbar sein (siehe Abbildung 5).

Um die relative Expression zu ermitteln, wurde zunächst der Durchschnitt der beiden C_T -Werte berechnet. Dann wurde innerhalb einer Gruppe (eine Zellkultur, eine Konzentration, alle Zeitpunkte) der größte C_T -Wert ermittelt ($\text{C}_{T\text{max}}$). Nach der Gleichung $2^{-(\text{C}_T - \text{C}_{T\text{max}})}$ wurde dann ein Wert errechnet, der bei den Housekeeping-Genen dazu verwendet wurde, einen Normalisierungsfaktor als geometrisches Mittel der 3 Werte zu berechnen.

Bei den untersuchten zirkadianen Genen wurde ebenso vorgegangen, nur wurde hier das Ergebnis der Gleichung $2^{-(\text{C}_T - \text{C}_{T\text{max}})}$ durch den Normalisierungsfaktor geteilt, um die Expression relativ zu den (als konstant exprimiert angenommenen) Housekeeping-Genen darzustellen. Um die Kurven der einzelnen Probanden besser miteinander vergleichen zu

können, wurde aus den Expressionswerten eines zirkadianen Gens jeweils ein individueller Durchschnitt gebildet und die einzelnen Werte durch diesen Durchschnitt geteilt. Mit den so ermittelten Ergebnissen konnte die relative Expression eines zirkadianen Gens im Diagramm bezogen auf die jeweiligen Zeitpunkte dargestellt und zur weiteren Auswertung genutzt werden.

2.11 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Zur statistischen Auswertung der PCR-Daten wurde die Software SPSS (IBM Corporation) verwendet. Die untersuchten Proben wurden in 6 Gruppen eingeteilt, die im Folgenden aufgezählt sind. Dabei steht HC (Healthy Control) für die Daten der Kontrollgruppe ohne neuropsychiatrische Erkrankungen und ADHS für die Daten der Gruppe der Probanden*innen mit einer ADHS-Diagnose.

1 = HC 0 μ M Dopamin

2 = HC 1 μ M Dopamin

3 = HC 10 μ M Dopamin

4 = ADHS 0 μ M Dopamin

5 = ADHS 1 μ M Dopamin

6 = ADHS 10 μ M Dopamin

Die Durchschnittswerte der Genexpression der einzelnen Gruppen wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten miteinander verglichen. Zunächst wurde dabei mittels Kolmogorov-Smirnow-Test geprüft, ob die Ergebnisse normalverteilt sind. Unter dieser Voraussetzung konnte ein parametrisches statistisches Verfahren gewählt werden. Da mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen werden sollten, wurden die Ergebnisse mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (oneway ANOVA) ausgewertet. Diese wurde sowohl für alle 6 Gruppen gemeinsam, als auch für die je 3 ADHS- und Kontrollgruppen getrennt durchgeführt. Bei statistisch signifikanten Unterschieden ($p < 0,05$) wurde mit einer post-hoc Analyse (Bonferroni-Korrektur) ermittelt, welche der Gruppen sich unterschieden.

Die zirkadiane Rhythmizität der Expression der zirkadianen Gene wurde mit dem Programm CircWave v. 1.4 (Dr. Roelof Hut; www.euclock.org) berechnet. Das Programm modelliert die Daten durch eine lineare harmonische Regressionsanpassung. Dabei verwendet das Modell Sinus- und Kosinusfunktionen, um periodische Muster in den Daten zu beschreiben. Die Hauptwellenfunktion wird erweitert um weitere Wellenfunktionen, um komplexe Muster in den Datensätzen genauer nachzubilden. (Oster et al. 2006).

3 Ergebnisse

3.1 Demographische Daten

Die Probandengruppe ADHS bestand aus 8 Männern und 4 Frauen. Das Durchschnittsalter betrug $45,08 \pm 18,07$ Jahre (Mittelwert (MW) $\pm$ Standardabweichung (SD)), der BMI lag bei $26,73 \pm 4,48$ kg/m² (MW $\pm$ SD). In der Kontrollgruppe ohne neuropsychiatrische Erkrankung (HC; 4 Männer, 8 Frauen) lag das Durchschnittsalter bei $41,50 \pm 14,04$ Jahren (MW $\pm$ SD) und der BMI bei $25,87 \pm 5,42$ kg/m² (MW $\pm$ SD). Die folgende Tabelle stellt die Ergebnisse der psychometrischen Tests in MW $\pm$ SD dar:

Tabelle 6: Ergebnisse der psychometrischen Tests; * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$

Test	ADHS (n = 12)	HC (n = 12)
IQ-Wert (MWT)	107,50 $\pm$ 10,91	110,25 $\pm$ 9,32
D-MEQ	44,33 $\pm$ 16,14*	58,83 $\pm$ 8,97*
WURS-k	41,50 $\pm$ 14,94**	7,17 $\pm$ 8,19**

Im Gegensatz zum Alter, Geschlecht, BMI und IQ-Wert (Multiple-Choice-Word-Test, MWT) lagen beim Morningness Eveningness Questionnaire (D-MEQ) und Wender-Utah-Rating-Scale (WURS-k) signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen vor (siehe Tabelle 6).

Die Verteilung der durch den D-MEQ ermittelten Chronotypen bei den Probanden*innen mit einer ADHS-Diagnose unterschied sich von der Kontrollgruppe. Während die Kontrollgruppe sich überwiegend auf den neutralen Chronotyp sowie teilweise auf die ausgeprägte und mäßige Morgenpräferenz verteilte, gab es in der Gruppe mit ADHS-Diagnose keine Probanden*innen mit definitiver Morgenpräferenz und eine geringere Anzahl mit neutralem Chronotyp. Beide Abendtypen (ausgeprägte und mäßige Abendpräferenz) waren bei Probanden*innen mit einer ADHS-Diagnose deutlich vertreten (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Ergebnisse des D-MEQ (Chronotypen)

Chronotyp (Punktzahl)	ADHS	HC
Definitiver Morgentyp (70-86)	0 (0,0 %)	2 (16,7 %)
Moderater Morgentyp (59-69)	3 (25,0 %)	3 (25,0 %)
Neutraler Typ (42-58)	4 (33,3 %)	7 (58,3 %)
Moderater Abendtyp (31-41)	2 (16,7 %)	0 (0,0 %)
Definitiver Abendtyp (14-30)	3 (25,0 %)	0 (0,0 %)

3.2 Viabilitätstest humaner dermaler Fibroblastenkulturen

Die Viabilität der humanen dermalen Fibroblasten (HDF) bei verschiedenen Dopaminkonzentrationen wurde ermittelt. Im Vergleich zu Zellkulturen ohne Dopamin ($83,0650 \pm 0,009 \%$, $MW \pm SD$) war die Viabilität nach Dopamin-Inkubation erhöht ($1 \mu M$ Dopamin $91,067 \pm 0,007 \%$; $10 \mu M$ Dopamin $90,204 \pm 0,002 \%$, $MW \pm SD$). Die Anzahl der Zellen pro Milliliter erhöhte sich bei Zugabe von $1 \mu M$ Dopamin um 147% , bei $10 \mu M$ um 154% .

Da die Viabilität in allen Fällen größer als 85% war, konnten die ausgewählten Konzentrationen für die Versuche verwendet werden.

Die Morphologie der mit unterschiedlichen Dopaminkonzentrationen behandelten Zellkulturen wurde untersucht. Auf den folgenden Aufnahmen sind als Beispiel je eine Zellkultur aus der Kontroll- und ADHS-Gruppe ausgewählt und jeweils mit 0 , 1 und $10 \mu M$ Dopamin dargestellt.

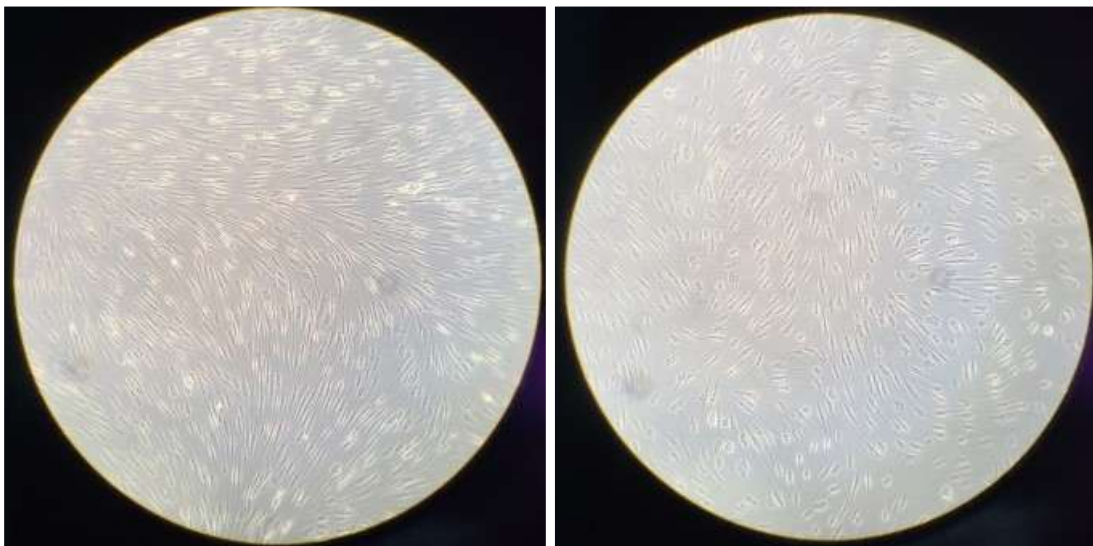


Abbildung 6: Zellkulturen HDF-P21 Passage (p) 7 (ADHS, links) und HDF-K01 p7 (HC, rechts) mit $0 \mu M$ Dopamin; 100-fache Vergrößerung

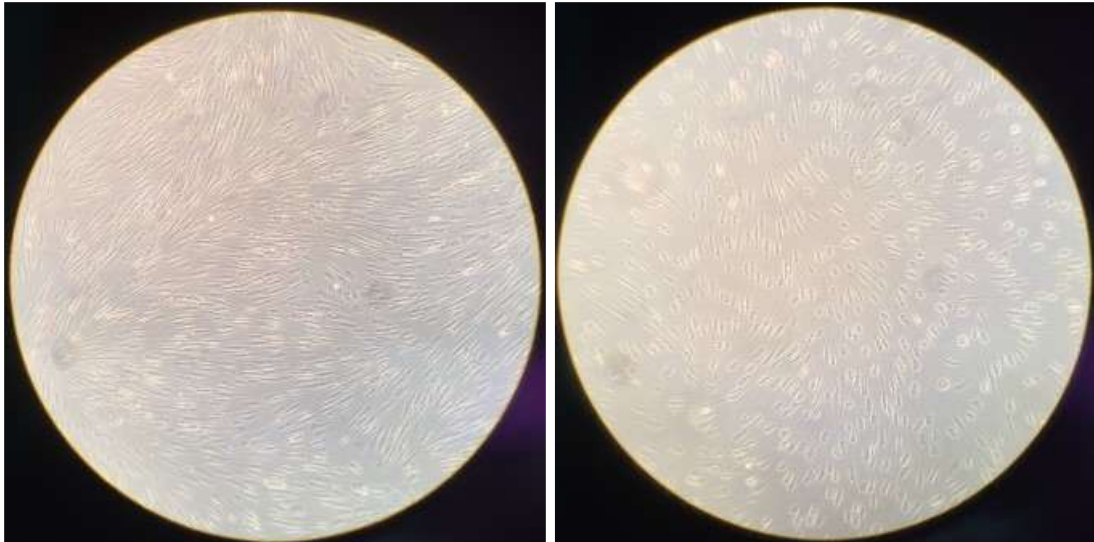


Abbildung 7: Zellkulturen nach 24 h Inkubation mit 1 μ M Dopamin; HDF-P21 p7 (ADHS, links), HDF-K01 p7 (HC, rechts); 100-fache Vergrößerung



Abbildung 8: Zellkulturen nach 24 h Inkubation mit 10 μ M Dopamin; HDF-P21 p7 (ADHS, links), HDF-K01 p7 (HC, rechts); 100-fache Vergrößerung

3.3 Zirkadiane Genexpression in humanen dermalen Fibroblasten (ADHS, HC) nach Zugabe von Dopamin

Die statistische Auswertung der qRT-PCR-Daten mit der Software CircWave (Dr. Roelof Hut, Groningen) ergab, dass *Bmal1*, *Cry1* und *Per3* in beiden Gruppen sehr rhythmisch exprimiert wurden ($p < 0,001$). Dagegen zeigt *Clock* in beiden Gruppen keine Rhythmizität außer bei Inkubation mit 1 μM Dopamin ($p < 0,05$). In Zellkulturen von Probanden*innen mit einer ADHS-Diagnose ergab eine Zugabe von 10 μM Dopamin keine signifikante Rhythmizität der *Clock*-Expression ($p > 0,05$). In den Zellkulturen der Kontrollgruppe zeigte sich der gleiche Effekt bei *Per1* und *Per2* ($p > 0,05$). Durch den Einfluss von 1 μM Dopamin wurde bei der Expression von *Clock* die Akrophase von $5,62 \pm 3,37$ h (MW $\pm$ SD, ohne Dopamin) auf $20,00 \pm 3,37$ h (MW $\pm$ SD) verschoben. In der Gruppe der Probanden*innen mit einer ADHS-Diagnose wurde durch Dopamineinfluss die Akrophase von *Per1* verändert, von $7,07 \pm 2,09$ h (MW $\pm$ SD, ohne Dopamin) zu $5,63 \pm 2,22$ h (MW $\pm$ SD, 1 μM Dopamin).

Der Kolmogorow-Smirnow-Test zeigte, dass die qRT-PCR-Daten normalverteilt waren ($p > 0,05$). Die einzige Ausnahme war *Per2* zum Zeitpunkt ZT16, hier betrug $p = 0,01$. Für die statistische Auswertung der qRT-PCR-Daten beider Gruppen (ADHS und HC) mit jeweils 3 Messungen (0 μM , 1 μM , 10 μM Dopamin) wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (one-way ANOVA) genutzt.

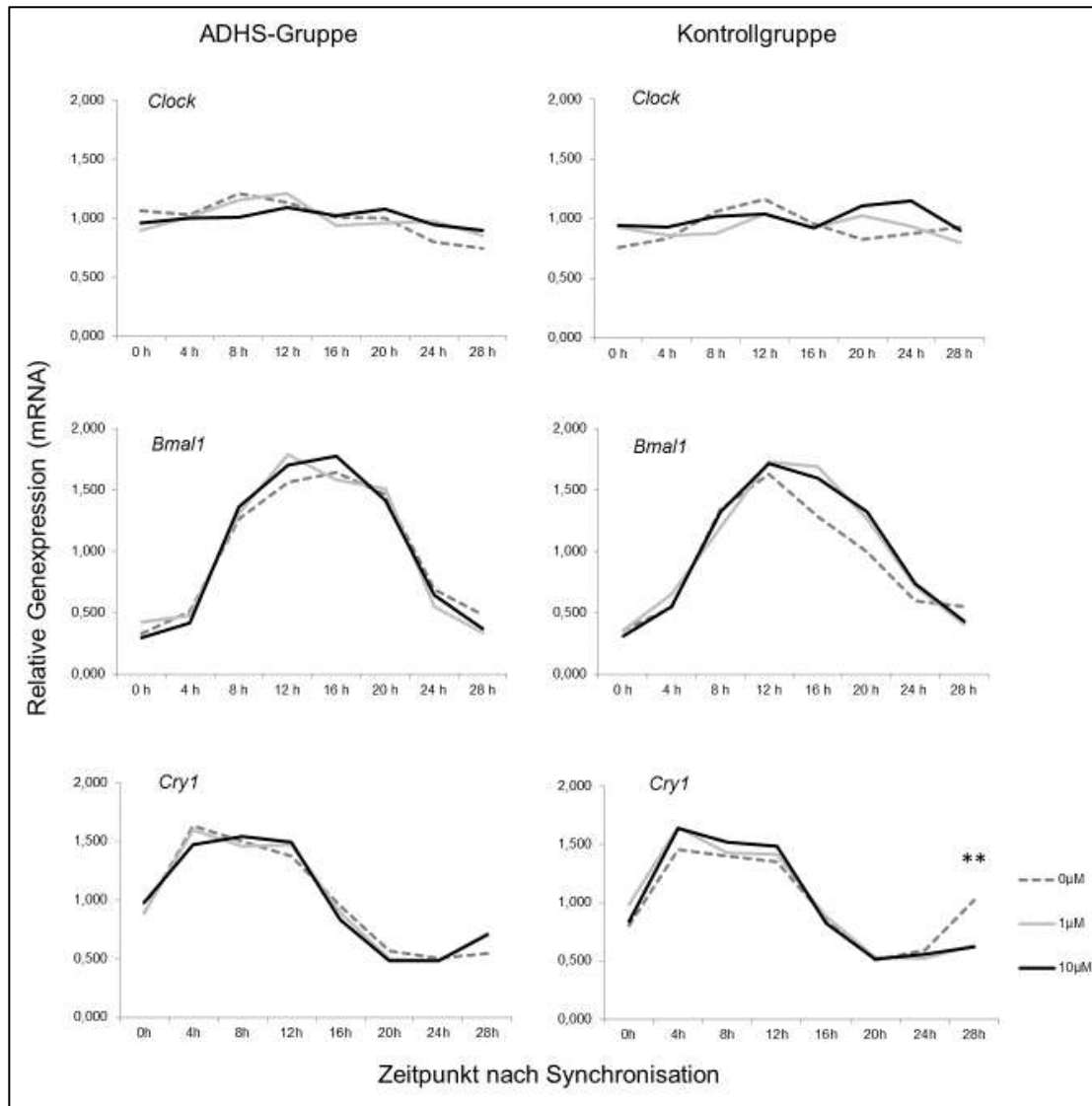


Abbildung 9: Relative Genexpression von *Clock*, *Bmal1* und *Cry1* im Verlauf von 28 h nach Inkubation mit Dopamin in den Konzentrationen 0, 1 und 10 μM . $**p < 0,01$

(Zur besseren Übersicht sind die Daten hier ohne Standardabweichungen (SD) dargestellt. Im Anhang befindet sich eine farbige Darstellung derselben Daten mit SD im Diagramm sowie eine Tabelle mit MW (Mittelwerten) und SD für die signifikanten Zeitpunkte.)

Die *Cry1*-Expression zum Zeitpunkt ZT28 zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (ADHS vs. HC, $p = 0,002$; $F = 4,451$) (siehe Abbildung 9). Ohne Dopamineinfluss wurde *Cry1* zu diesem Zeitpunkt bei Kontrollen ohne neuropsychiatrische Erkrankung signifikant stärker exprimiert als bei Probanden*innen mit einer ADHS-Diagnose ($p < 0,001$, post-hoc Analyse (Bonferroni-Korrektur)). Humane dermale Fibroblasten von Kontrollpersonen ohne neuropsychiatrische Erkrankung mit und ohne Zugabe von Dopamin zeigten statistisch signifikante Unterschiede in der zirkadianen Genexpression von *Cry1* zum Zeitpunkt ZT28 ($p = 0,008$; $F = 5,594$). Die post-hoc Analyse (Bonferroni-Korrektur) ergab, dass HDF gesunder Kontrollen mit 1 μM Dopamin ($p = 0,019$) und 10 μM Dopamin

($p = 0,018$) jeweils eine signifikant geringere Genexpression zeigten als HDF unbehandelter gesunder Kontrollen.

Die *Per2*-Expression zeigte zum Zeitpunkt ZT4 signifikante Differenzen ($p = 0,003$; $F = 4,075$) in HDF von Kontrollen und Studienteilnehmer*innen mit einer ADHS-Diagnose (siehe Abbildung 10). Mittels Bonferroni-Korrektur konnte festgestellt werden, dass die Genexpression zwischen HDF von Kontrollen ohne neuropsychiatrische Erkrankung und HDF von Probanden*innen mit einer ADHS-Diagnose nach 10 μ M Dopamininkubation signifikant unterschiedlich war ($p = 0,011$). Außerdem unterschied sich die Expression unter gleichem Dopamineinfluss (10 μ M) zwischen ADHS-Patienten*innen und Kontrollen signifikant ($p = 0,011$). Die *Per2*-Expression in HDF von Kontrollen ohne neuropsychiatrische Erkrankung mit und ohne Dopamininkubation unterschied sich signifikant ($p = 0,043$; $F = 3,473$) zum ZT4. Post-hoc Tests zeigten, dass die Expression von *Per2* zum Zeitpunkt ZT4 nach Inkubation mit 10 μ M Dopamin signifikant geringer ist als ohne Dopamin-Zugabe ($p = 0,040$).

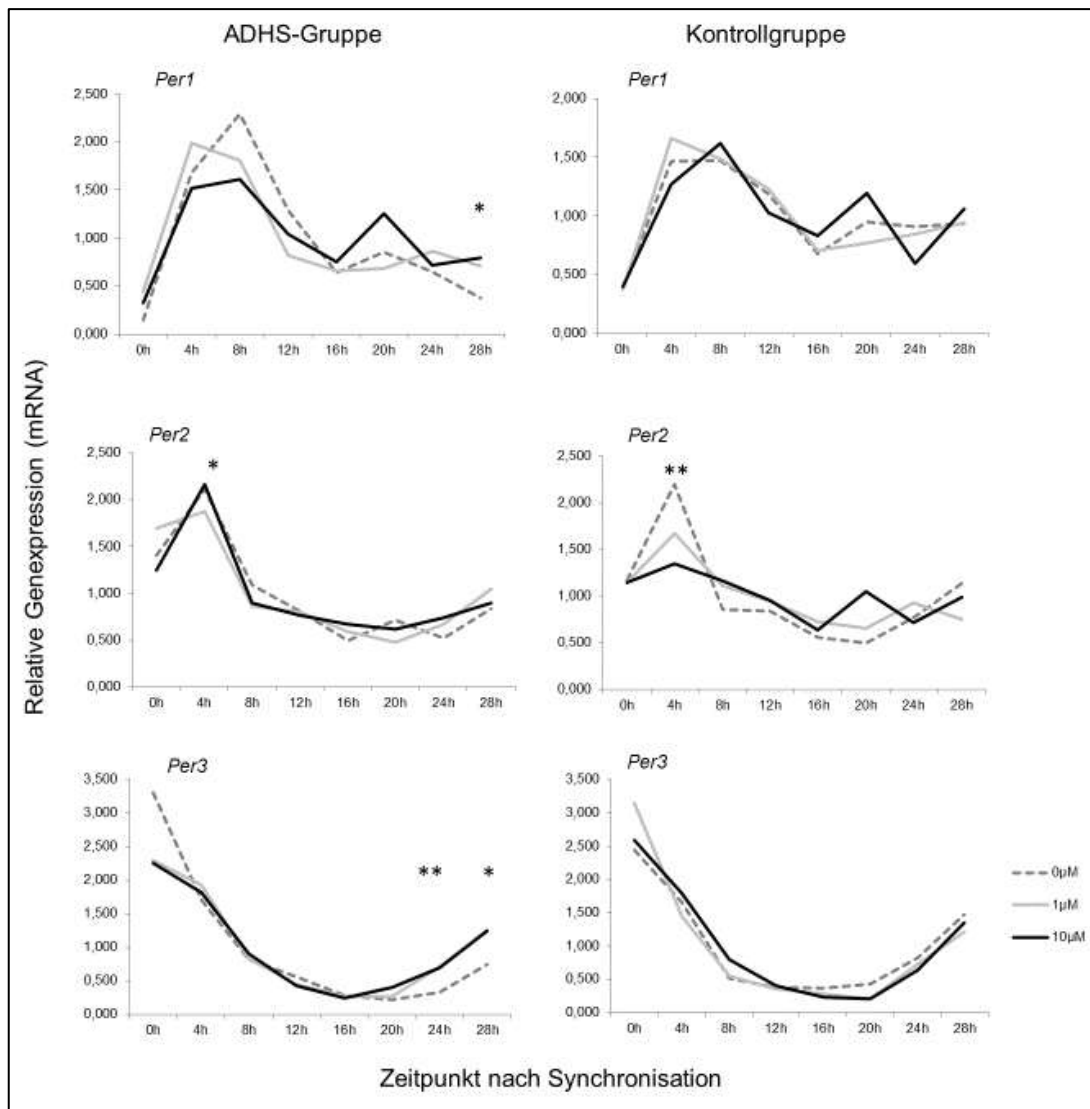


Abbildung 10: Relative Genexpression von *Per1*, *Per2* und *Per3* im Verlauf von 28 h nach Inkubation mit Dopamin in den Konzentrationen 0, 1 und 10 μM . * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Die einfaktorielle Varianzanalyse der Daten der mit verschiedenen Dopaminkonzentrationen (1 oder 10 μM Dopamin) behandelten und unbehandelten (0 μM Dopamin) HDF von Probanden*innen mit einer ADHS-Diagnose zeigte bei den folgenden zirkadianen Genen und Zeitpunkten einen signifikanten Unterschied: *Per1* bei ZT28 ($p = 0,012$; $F = 5,103$) und *Per3* bei ZT24 ($p = 0,002$; $F = 7,703$) sowie ZT28 ($p = 0,033$; $F = 3,801$) (siehe Abbildung 10). Die *Per2*-Expression war signifikant unterschiedlich zum ZT4 in HDF von Probanden*innen mit einer ADHS-Diagnose ($p = 0,024$; $F = 4,170$).

Die post-hoc Analyse (Bonferroni-Korrektur) ergab, dass *Per1* zum Zeitpunkt ZT28 sowohl durch eine geringe (1 μM ; $p = 0,049$) als auch durch eine hohe Dopaminkonzentration (10 μM ; $p = 0,016$) stärker exprimiert wurde.

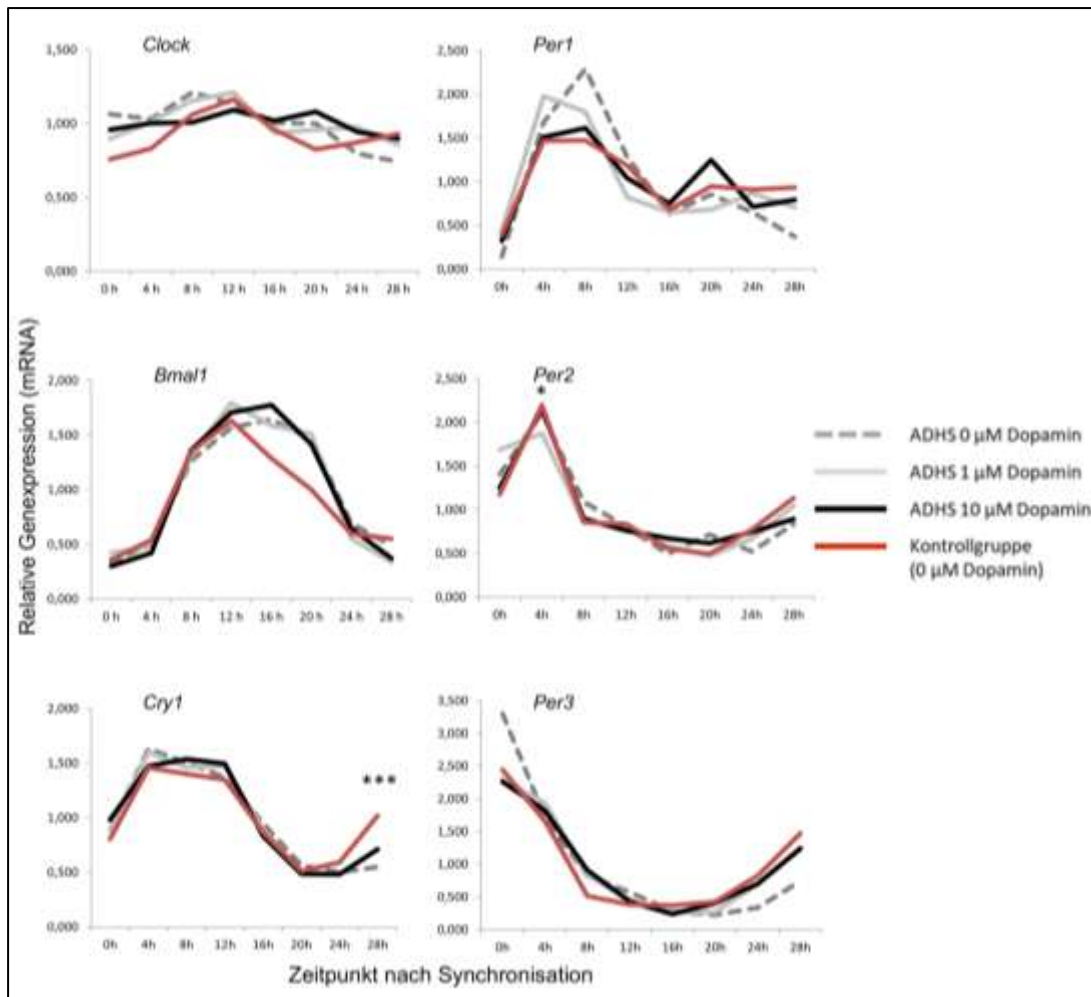


Abbildung 11: Relative Genexpression der ADHS-Gruppe (0, 1, 10 μM Dopamin) und Kontrollgruppe ohne Dopamin. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

Die Zugabe von Dopamin führte zu einer Erhöhung der *Per3*-Expression in HDF von Probanden*innen mit einer ADHS-Diagnose zu den Zeitpunkten ZT24 und ZT28. Signifikant war bei ZT24 der Unterschied zwischen 0 μM und 1 μM Dopamin ($p = 0,003$), sowie der Unterschied zwischen 0 μM und 10 μM ($p = 0,010$). Die *Per3*-Expression zum Zeitpunkt ZT28 unterscheidet sich signifikant zwischen 0 μM und 1 μM Dopamin ($p = 0,039$).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Dopamin auf die zirkadiane Genexpression humaner dermaler Fibroblasten aus Hautbiopsien von Probanden*innen mit einer ADHS-Diagnose untersucht und mit gesunden Kontrollpersonen ohne neuropsychiatrische Erkrankung verglichen. Signifikante Veränderungen durch Dopamininkubation waren bei der Expression der zirkadianen Gene *Cry1*, *Per1*, *Per2* und *Per3* vorhanden. In der Fachliteratur sind bereits einige Studien vorhanden, die im Folgenden ins Verhältnis zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gebracht werden.

In einer Studie von 2009 wurde am Zell- und Tiermodell mit *Clock*-Knockout-Mäusen der Einfluss von Dopaminrezeptoren auf die neuronale Expression von zirkadianen Genen untersucht. Eine systemische Injektion des Dopaminrezeptor-Agonisten Quinpirol führte zu einer Veränderung der *mPer1*-Expression im Striatum abhängig vom Zeitpunkt der Injektion (Imbesi et al. 2009).

In einer anderen Untersuchung mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass Methylphenidat, ein Psychostimulans und häufig verwendetes ADHS-Medikament, welches das extrazelluläre Dopamin im Gehirn steigert, für eine erhöhte nächtliche Aktivität der Tiere sowie eine Verschiebung von Aktivität und Schlaf auf einen späteren Zeitpunkt sorgte (Antle et al. 2012).

Methylphenidat zeigte außerdem in einer weiteren Studie Einfluss auf die Proteinexpression zirkadianer Gene (*Clock*, *Per1*, *Per2*) in verschiedenen Bereichen des Gehirns im Mausmodell. Im SCN und Nucleus paraventricularis wurde die *Per2*-Expression signifikant verringert, im Nucleus paraventricularis und der Area tegmentalis ventralis die *Per1*-Expression gesteigert. Im Cortex cerebri zeigte die Behandlung mit Methylphenidat keine veränderte Expression von *Clock*, *Per1* und *Per2*. Im dorsalen Striatum wurde die *Per2*-Expression gesteigert (Baird et al. 2013).

Der Einfluss von Dopamin auf die zirkadiane Genexpression wurde auch bei *Drosophila melanogaster* untersucht. Mutanten ohne neurale Expression der Tyrosin-Hydroxylase zeigten eine schwächere zirkadiane Rhythmik als der Wildtyp (Hirsh et al. 2010). Da die Tyrosin-Hydroxylase als Enzym aus Tyrosin L-Dopa, den Vorläufer von Dopamin, synthetisiert, kann man aus dieser Studie ableiten, dass weniger Dopamin zu einer schwächeren zirkadianen Rhythmik führt.

Die Tyrosin-Hydroxylase wird in einem 24-stündigen Hell- und Dunkelzyklus (12 h hell, 12 h dunkel) an Retinazellen von Hühnerembryonen rhythmisch exprimiert. In vollständiger Dunkelheit konnte keine Expression des Enzyms festgestellt werden (Lima et al. 2011).

Die Dopamin-Transmission wird durch *Clock* beeinflusst, da *Clock* die Expression der Tyrosin-Hydroxylase hemmt. Bei *Clock*-Mutanten wird in der Area tegmentalis ventralis eine erhöhte Aktivität der Dopamin-Neuronen sowie eine veränderte Regulation von Dopamin-assoziierten Genen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen festgestellt (Parekh et al. 2015).

Bei Zebrafischen mit einer Genmutation von *per1b* zeigten sich verringerte Dopaminspiegel sowie ADHS-ähnliches Verhalten. Die Studie zeigte, dass die zirkadiane Uhr die Genexpression der Enzyme MAO und Dopamin- β -Hydroxylase, die beide notwendig für die Dopaminsynthese sind, beeinflusst (Huang et al. 2015).

In einer Studie zum Einfluss von *Per2* auf Methamphetamin-Abhängigkeit wurden Mäuse mit einer Überexpression von *Per2* und *Per2*-Knockout-Mäuse mit dem Wildtyp verglichen. Bei den beiden transgenen Maustypen zeigten sich veränderte Expressionen der Dopamin-verbundenen Gene (für MAO, DA-Rezeptor 1, DA-Rezeptor 2, DA-Transporter, Tyrosin-Hydroxylase, cAMP response element-binding protein 1). Der Dopaminspiegel war bei den *Per2*-Knockout-Mäusen erhöht, bei einer *Per2*-Überexpression war der Effekt gegenteilig. Aus den Ergebnissen schließen die Studienautoren*innen, dass die *Per2*-Expression über das dopaminerge System Einfluss auf die suchterzeugenden Effekte von Methamphetamin haben (Kim et al. 2019).

In einer weiteren Studie wurde am Mausmodell die Unterscheidung von Zeitintervallen im Bereich von Sekunden bis Minuten („Interval Timing“) untersucht. Dabei kam es unter konstantem Licht zu einer Abnahme der Rhythmizität des Dopaminspiegels im Striatum, welcher vermutlich durch *Per2* reguliert wird. Die Autoren vermuten, dass diese Veränderung zu einer schlechteren Bewältigung der Zeit-Aufgabe führt (Bussi et al. 2014).

Eine direkte Verbindung zwischen extrazellulären Dopaminspiegeln und der Expression des Proteins PER2 konnte im dorsalen Striatum der männlichen Wistar-Ratte nachgewiesen werden. Hier wird die PER2-Proteinexpression durch die tägliche Aktivierung des D2-Dopaminrezeptors beeinflusst (Hood et al. 2010).

Insgesamt deuten die Ergebnisse der Studien darauf hin, dass Dopamin und zirkadiane Gene sich wechselseitig beeinflussen. Dopamin (bzw. Erhöhung der Dopaminkonzentration durch Methylphenidat) hat Einfluss auf die zirkadiane Genexpression auf zellulärer Ebene und den zirkadianen Rhythmus im Tiermodell. Diese These wird auch von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gestützt. Auch umgekehrt haben zirkadiane Gene einen Einfluss auf Dopaminrezeptoren und Enzyme, die an der Dopaminsynthese beteiligt sind.

Für die vorliegende Arbeit wurden jeweils 12 Probanden*innen mit einer ADHS-Diagnose und Kontrollen ohne neuropsychiatrische Erkrankung rekrutiert. Diese Gruppengröße ist statistisch signifikant und repräsentativ (Thaben und Westermarck 2016). Die Kontrollgruppe wurde passend zur ADHS-Gruppe rekrutiert, d.h. durch die gezielte Auswahl der Probanden*innen gab es kaum wesentliche Unterschiede hinsichtlich Alter, Geschlecht, BMI und Intelligenzquotient. Dadurch ist die Vergleichbarkeit der beiden Gruppen gegeben. Die Verteilung der Chronotypen (unbehandelte Patienten*innen mit einer ADHS-Diagnose vermehrt später Chronotyp bzw. Abendpräferenz, Kontrollpersonen überwiegend neutraler Chronotyp) entspricht den Erwartungen anhand der Literatur (Coogan und McGowan 2017).

Die Wahl eines *in vitro*-Modells als erste Stufe von Untersuchungen ist in der Psychopharmakologie üblich, hat aber neben Vorteilen auch einige Limitationen. Eine konstante, reproduzierbare Dopaminkonzentration kann direkt an der Zelle erreicht werden. Im Organismus werden periphere Uhren durch äußere Einflüsse (Tag-Nacht-Rhythmus, Essenszeiten) beeinflusst. Neben den Umweltreizen werden periphere Gewebe auch durch den SCN reguliert. Im Zellmodell können Umwelteinflüsse (z.B. Hell-Dunkel-Rhythmus) besser kontrolliert werden. Das Zellmodell besitzt den Vorteil, dass die Charakteristika des Sponsors noch vorhanden sind; z.B. der Chronotyp des Sponsors (Nagoshi et al. 2004; Pagani et al. 2010; Kálmán et al. 2016; Faltraco et al. 2023). Dadurch kann der Einfluss von Dopamin auf die zirkadiane Rhythmik auf zellulärer Ebene untersucht werden. Auf der anderen Seite können jedoch die genannten Wechselwirkungen die tatsächlichen Folgen einer erhöhten Dopaminkonzentration im Organismus beeinflussen. Daher sollten die vorliegenden Ergebnisse zunächst in Verifikationsstudien weiter überprüft werden.

Ein weiterer Vorteil der Verwendung einer Zellkultur ist das Fehlen eines möglichen Placebo-Effekts bei Probanden*innen. Die Teilnahme an der Studie ist für die Probanden*innen mit geringer Belastung verbunden. Neben den psychometrischen Untersuchungen werden die Probanden*innen einmalig um eine Hautbiopsie gebeten.

Dopamin bewirkte zu einigen Zeitpunkten bei Zellkulturen von Probanden*innen mit einer ADHS-Diagnose und Kontrollpersonen unterschiedliche Veränderungen der Expressionskurven. Beispielsweise sorgte die Dopaminzugabe bei *Clock* ZT0 von HDF von Studienteilnehmer*innen mit einer ADHS-Diagnose für eine geringere, in HDF der Kontrollgruppe jedoch für eine höhere Expression. Der gleiche Effekt zeigte sich bei *Cry1* ZT4 für 10 μ M Dopamin. Bei ZT28 wurde *Cry1* mit 10 μ M Dopamin in Zellkulturen der ADHS-Gruppe stärker, in denen der Kontrollgruppe schwächer exprimiert. Weitere Gene und

Zeitpunkte, an denen der Einfluss von Dopamin einen solchen Effekt bewirkte, waren: *Per1* ZT8 und ZT24, *Per2* ZT4, ZT8, ZT20 und ZT28 sowieso bei *Per3* ZT0 und ZT20 bis ZT28.

Die Inkubation mit 1 μ M Dopamin bewirkte außerdem eine Rhythmizität der *Clock*-Expression. Dieser Effekt konnte ohne Dopamin und mit 10 μ M Dopamin nicht festgestellt werden. Ein Einfluss von Noradrenalin auf die Rhythmizität von *Clock* konnte nachgewiesen werden (Palm et al. 2021) sowie ein Zusammenhang zwischen Noradrenalin und der Synchronisation der zirkadianen Rhythmik (Li und Cassone 2015). Somit ist eine Beteiligung von monoaminen Neurotransmittern in zirkadianen Signalwegen wahrscheinlich.

Die zirkadianen Genexpressionen von HDF von Probanden*innen mit einer ADHS-Diagnose wurden mit der Expression der zirkadianen Gene der Kontrollen ohne neuropsychiatrische Erkrankungen verglichen (siehe Abbildung 11). Die Zugabe von 10 μ M Dopamin bewirkte eine Annäherung der *Per1*-Expression der ADHS-Gruppe an die Kontrollgruppe; insbesondere zwischen den Zeitpunkten ZT0 bis ZT16. Die relative Expression von *Per2* von Fibroblastenkulturen von Probanden*innen mit einer ADHS-Diagnose wurde durch Zugabe von Dopamin (1 μ M und 10 μ M) der Expression der Kontrollgruppe angeglichen. Die Inkubation mit Dopamin (1 μ M und 10 μ M) bewirkte, dass sich die *Per3*-Expression der HDF von Studienteilnehmer*innen mit einer ADHS-Diagnose an die Expressionswerte der Kontrollgruppe annäherte. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Dopamin dafür sorgt, dass sich die zirkadiane Rhythmik von ADHS-Patienten*innen verbessert und ihr Tag-Nacht-Rhythmus dem von Personen ohne neuropsychiatrische Erkrankung angleicht. Dies könnte zu einer Verbesserung der Schlafqualität, einer Milderung der Symptome sowie eine bessere Anpassung an sozial-gesellschaftliche Normen führen.

5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die bisherige Studienlage wird durch die neuen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergänzt. Schon zuvor konnte eine Korrelation zwischen Dopamin und zirkadianen Genen in verschiedenen experimentellen Untersuchungen nachgewiesen werden. Bislang hatte noch keine Studie den Einfluss von Dopamin auf die zirkadiane Genexpression in Fibroblasten-Kulturen von Patienten*innen mit einer ADHS-Diagnose und Kontrollpersonen ohne neuropsychiatrische Erkrankung untersucht.

Die Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass ADHS einen Einfluss auf die zirkadiane Rhythmik hat. Des Weiteren ist zu erkennen, dass Dopamin im Fibroblasten-Modell eine Annäherung der Expression der zirkadianen Gene, insbesondere *Per2* und *Per3* an die Expressionswerte der Kontrollgruppe ohne neuropsychiatrische Erkrankung bewirkt. Dieses Erkenntnis könnte darauf hinweisen, dass Dopamin die Schlafqualität, den Tag-Nacht-Rhythmus und die Symptome von ADHS-Patienten*innen verbessern kann. Auch bei den zirkadianen Genen *Per1* und *Cry1* konnten signifikante Veränderungen der Expression durch Inkubation mit Dopamin festgestellt werden.

Da einige ADHS-Medikamente wie Methylphenidat in den Dopaminhaushalt eingreifen, ist es möglich, dass die Medikamenteneinnahme einen Einfluss auf die zirkadiane Rhythmik bei Patienten*innen mit einer ADHS-Diagnose hat und eventuell über diesen Wirkmechanismus die Symptome der Erkrankung mildert.

Um die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu überprüfen, sind weitere Studien notwendig. Zunächst sollten dafür Verifikationsstudien unter *in vitro*-Bedingungen durchgeführt werden. Bestätigen sich die beobachteten Ergebnisse, können gegebenenfalls weiterführende klinische Studien geplant werden, um zu evaluieren, ob Substanzen mit Wirkung auf den dopaminergen Stoffwechsel auch auf systemischer Ebene, unter Berücksichtigung physiologischer Wechselwirkungen im Organismus, eine modulierende Wirkung auf die zirkadiane Rhythmik von Patienten*innen mit einer ADHS-Diagnose haben. Fortschritte in diesem Forschungsbereich sind essentiell, um Ansätze zur Stabilisierung des zirkadianen Systems der ADHS-Patienten*innen zu entwickeln und so eine bessere Anpassung an gesellschaftliche Zeitstrukturen sowie eine Reduktion der symptomatischen Belastung zu ermöglichen.

Anhang

Ergänzende Materialien

Übersicht Komponenten der Reversen Transkription SuperScript III Cells direct Kit (Invitrogen) (Thermo Fisher Scientific 2025):

Mix 1:

1. Oligo(dT)₂₀ (50 µM) = Primer, der aus 20 Desoxythymidinsäureresten besteht, die mit dem Poly-A-Ende der mRNA hybridisieren
2. 10mM dNTP mix = vorgemischte wässrige Lösungen von dATP, dCTP, dGTP & dTTP (Vorstufen der Nukleinsäuren für DNA)

Mix 2:

1. 5x RT buffer = Reaktionspuffer, enthält Tris-HCl und KCl für optimalen pH-Wert und Ionen für die Reaktion
2. RNaseOut™ (40U/µl) = Ribonuklease-Inhibitor (saures Protein, hemmt RNase A, B und C)
3. SuperScript™ III RT (200 U/µl) = Reverse-Transkriptase (RNA-dependent DNA polymerase); Enzym, das die RT katalysiert
4. 0.1 M DTT = Dithiothreiol (Stabilisierung der Reversen Transkriptase für optimale Enzymaktivität durch Reduktion von Disulfid-Brücken)

RNase H E.coli (2 U/µl): entfernt verbliebende RNA

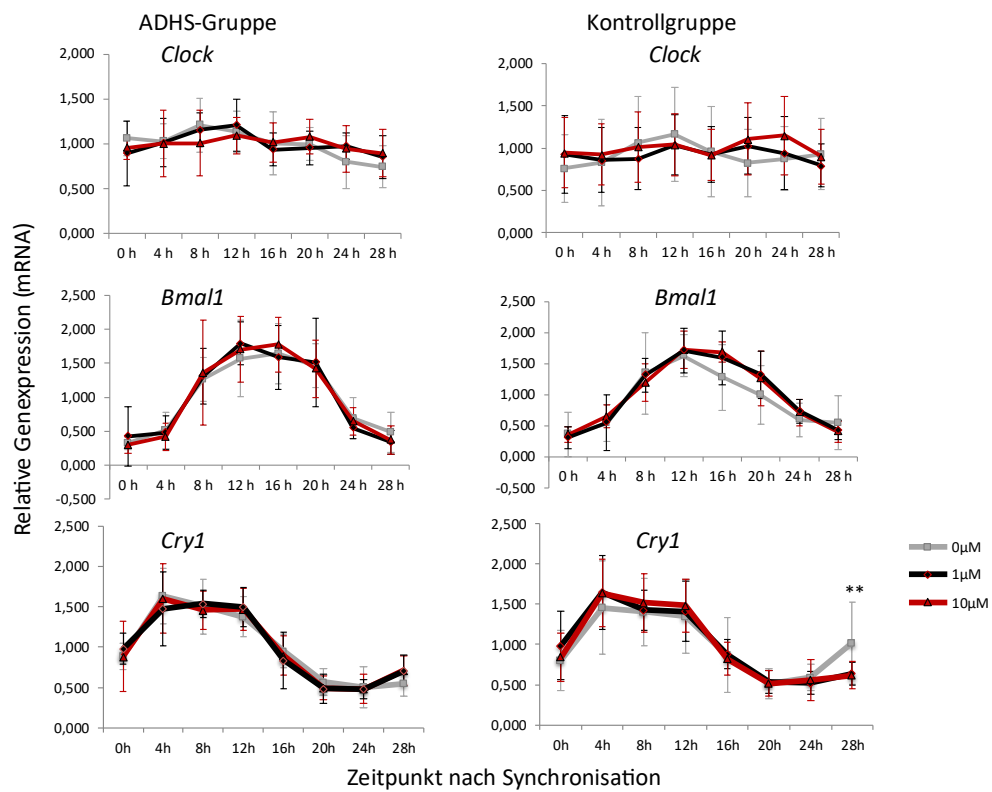


Abbildung 12: Relative Genexpression mit SD von *Clock*, *Bmal1* und *Cry1* im Verlauf von 28 h nach Inkubation mit Dopamin in den Konzentrationen 0, 1 und 10 μM . $**p < 0,01$

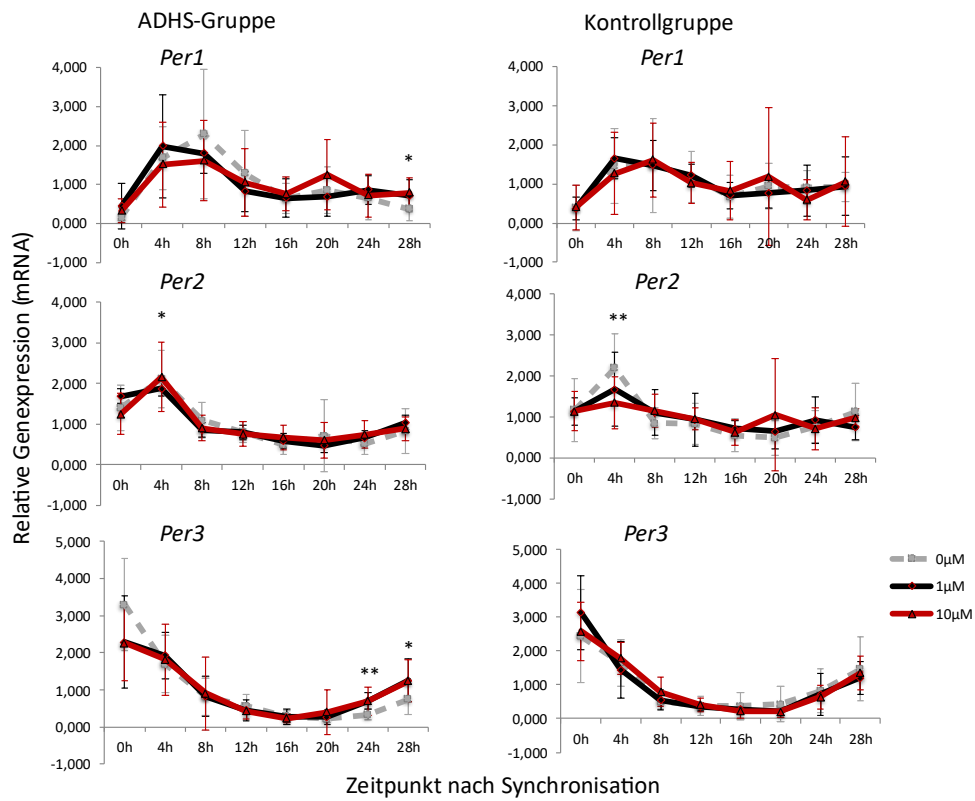


Abbildung 13: Relative Genexpression mit SD von Per1, Per2 und Per3 im Verlauf von 28 h nach Inkubation mit Dopamin in den Konzentrationen 0, 1 und 10 μM . * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

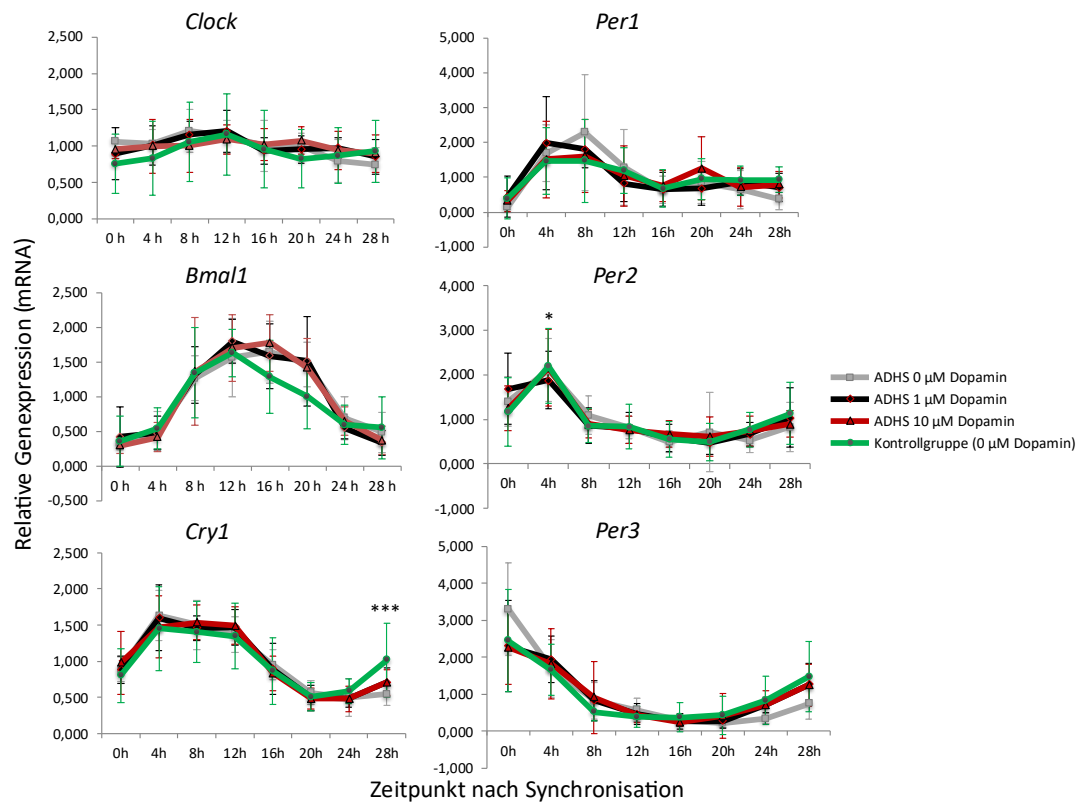


Abbildung 14: Relative Genexpression (mit SD) der ADHS-Gruppe (0, 1, 10 μM Dopamin) und Kontrollgruppe ohne Dopamin. *p < 0,05, ***p > 0,001

Tabelle 8: Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der relativen Genexpression für signifikante Zeitpunkte

Gene	ZT	0 µM Dopamin HC	1 µM Dopamin HC	10 µM Dopamin HC	0 µM Dopamin ADHS	1 µM Dopamin ADHS	10 µM Dopamin ADHS
		(Mittelwert ± SD)	(Mittelwert ± SD)	Mittelwert ± SD	(Mittelwert ± SD)	(Mittelwert ± SD)	(Mittelwert ± SD)
<i>Cry1</i>	28	1,019 ± 0,512	0,637 ± 0,139	0,618 ± 0,173	0,549 ± 0,155	0,711 ± 0,193	0,709 ± 0,177
<i>Per1</i>	28	0,932 ± 0,374	0,942 ± 0,751	1,058 ± 1,148	0,372 ± 0,302	0,708 ± 0,407	0,793 ± 0,388
<i>Per2</i>	4	2,199 ± 0,839	1,675 ± 0,899	1,349 ± 0,627	2,113 ± 0,703	1,875 ± 0,647	2,161 ± 0,858
<i>Per3</i>	24	0,824 ± 0,659	0,721 ± 0,617	0,639 ± 0,352	0,336 ± 0,143	0,703 ± 0,214	0,701 ± 0,387
	28	1,471 ± 0,955	1,211 ± 0,489	1,354 ± 0,497	0,745 ± 0,416	1,254 ± 0,579	1,243 ± 0,562

Literaturverzeichnis

Abbasi, Sepideh; Sinha, Sarthak; Labit, Elodie; Rosin, Nicole L.; Yoon, Grace; Rahmani, Waleed et al. (2020): Distinct Regulatory Programs Control the Latent Regenerative Potential of Dermal Fibroblasts during Wound Healing. In: *Cell stem cell* 27 (3), 396-412.e6. DOI: 10.1016/j.stem.2020.07.008.

American Psychiatric Association (2000): Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revision (DSM-IV-TR). Arlington, VA: American Psychiatric Association (1).

American Psychiatric Association (2013): Diagnostic and statistical manual of mental disorders. DSM-5. 5th ed. Washington D.C.: American Psychiatric Association.

Antle, Michael C.; van Diepen, Hester C.; Deboer, Tom; Pedram, Pardis; Pereira, Rob Rodrigues; Meijer, Johanna H. (2012): Methylphenidate modifies the motion of the circadian clock. In: *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 37 (11), S. 2446–2455. DOI: 10.1038/npp.2012.103.

Aschoff, Jürgen (1954): Zeitgeber der tierischen Tagesperiodik. In: *Naturwissenschaften* 41 (3), S. 49–56.

Asherson, Philip; Agnew-Blais, Jessica (2019): Annual Research Review: Does late-onset attention-deficit/hyperactivity disorder exist? In: *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines* 60 (4), S. 333–352. DOI: 10.1111/jcpp.13020.

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

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

Banaschewski, Tobias; Hohmann, Sarah; Millenet, Sabina (2017): Langfassung der interdisziplinären evidenz- und konsensbasierten (S3) Leitlinie "Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung im Kindes-, Jugend- und Erwachsenenalter". In: *AWMF online*.

- Bangma, Dorien F.; Koerts, Janneke; Fuermaier, Anselm B. M.; Mette, Christian; Zimmermann, Marco; Toussaint, Anna K. et al. (2019): Financial decision-making in adults with ADHD. In: *Neuropsychology* 33 (8), S. 1065–1077. DOI: 10.1037/neu0000571.
- Barican, Jenny Lou; Yung, Donna; Schwartz, Christine; Zheng, Yufei; Georgiades, Katholiki; Waddell, Charlotte (2022): Prevalence of childhood mental disorders in high-income countries: a systematic review and meta-analysis to inform policymaking. In: *Evidence-based mental health* 25 (1), S. 36–44. DOI: 10.1136/ebmental-2021-300277.
- Barion, Ana; Zee, Phyllis C. (2007): A clinical approach to circadian rhythm sleep disorders. In: *Sleep medicine* 8 (6), S. 566–577. DOI: 10.1016/j.sleep.2006.11.017.
- Barkley, Russell A.; Smith, Karen Müller; Fischer, Mariellen (2019): ADHD risk genes involved in dopamine signaling and metabolism are associated with reduced estimated life expectancy at young adult follow-up in hyperactive and control children. In: *Am. J. Med. Genet.* 180 (3), S. 175–185. DOI: 10.1002/ajmg.b.32711.
- Beaulieu, Jean-Martin; Espinoza, Stefano; Gainetdinov, Raul R. (2015): Dopamine receptors - IUPHAR Review 13. In: *British journal of pharmacology* 172 (1), S. 1–23. DOI: 10.1111/bph.12906.
- Biederman, J.; Mick, E.; Faraone, S. V. (2000): Age-dependent decline of symptoms of attention deficit hyperactivity disorder: impact of remission definition and symptom type. In: *Am J Psychiatry* 157 (5), S. 816–818. DOI: 10.1176/appi.ajp.157.5.816.
- Bonvicini, C.; Faraone, S. V.; Scassellati, C. (2016): Attention-deficit hyperactivity disorder in adults: A systematic review and meta-analysis of genetic, pharmacogenetic and biochemical studies. In: *Molecular psychiatry* 21 (7), S. 872–884. DOI: 10.1038/mp.2016.74.
- Brown, Steven A.; Fleury-Olela, Fabienne; Nagoshi, Emi; Hauser, Conrad; Juge, Cristiana; Meier, Christophe A. et al. (2005): The period length of fibroblast circadian gene expression varies widely among human individuals. In: *PLoS biology* 3 (10), e338. DOI: 10.1371/journal.pbio.0030338.
- Brown, Steven A.; Zimbrunn, Gottlieb; Fleury-Olela, Fabienne; Preitner, Nicolas; Schibler, Ueli (2002): Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. In: *Current Biology* 12 (18), S. 1574–1583. DOI: 10.1016/s0960-9822(02)01145-4.
- Brunkhorst-Kanaan, Nathalie; Libutzki, Berit; Reif, Andreas; Larsson, Henrik; McNeill, Rhiannon V.; Kittel-Schneider, Sarah (2021): ADHD and accidents over the life span - A

- systematic review. In: *Neuroscience and biobehavioral reviews* 125, S. 582–591. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2021.02.002.
- Buhr, Ethan D.; Takahashi, Joseph S. (2013): Molecular components of the Mammalian circadian clock. In: *Handbook of experimental pharmacology* (217), S. 3–27. DOI: 10.1007/978-3-642-25950-0_1.
- Bussi, Ivana L.; Levín, Gloria; Golombek, Diego A.; Agostino, Patricia V. (2014): Involvement of dopamine signaling in the circadian modulation of interval timing. In: *The European journal of neuroscience* 40 (1), S. 2299–2310. DOI: 10.1111/ejn.12569.
- Buttlar, Jann; Klein, Carlo; Bruch, Alexander; Fachinger, Alexandra; Funk, Johanna; Hawer, Harmen; Kuijpers, Aaron (2020): Tutorium Genetik. Eine (ausführliche) Einführung. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- Buyse, D. J.; Reynolds, C. F.; Monk, T. H.; Berman, S. R.; Kupfer, D. J. (1989): The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research. In: *Psychiatry research* 28 (2), S. 193–213. DOI: 10.1016/0165-1781(89)90047-4.
- Cahill, Anne L.; Ehret, Charles F. (1981): Circadian Variations in the Activity of Tyrosine Hydroxylase, Tyrosine Aminotransferase, and Tryptophan Hydroxylase: Relationship to Catecholamine Metabolism. In: *J Neurochem* 37 (5), S. 1109–1115. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1981.tb04660.x.
- Cherkasova, Mariya V.; Faridi, Nazlie; Casey, Kevin F.; O'Driscoll, Gillian A.; Hechtman, Lily; Joobar, Ridha et al. (2014): Amphetamine-induced dopamine release and neurocognitive function in treatment-naïve adults with ADHD. In: *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 39 (6), S. 1498–1507. DOI: 10.1038/npp.2013.349.
- Cho, Han; Zhao, Xuan; Hatori, Megumi; Yu, Ruth T.; Barish, Grant D.; Lam, Michael T. et al. (2012): Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- α and REV-ERB- β . In: *Nature* 485 (7396), S. 123–127. DOI: 10.1038/nature11048.
- Chokhawala, K.; Stevens, L. (2023): Antipsychotic Medications. Hg. v. StatPearls. Treasure Islands (FL): Stat Pearls Publishing. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519503/>, zuletzt geprüft am 28.06.2023.
- Christiansen, H.; Kis, B.; Hirsch, O.; Matthies, S.; Hebebrand, J.; Uekermann, J. et al. (2012): German validation of the Conners Adult ADHD Rating Scales (CAARS) II: reliability, validity, diagnostic sensitivity and specificity. In: *European psychiatry : the*

journal of the Association of European Psychiatrists 27 (5), S. 321–328. DOI: 10.1016/j.eurpsy.2010.12.010.

Coogan, A. N.; Schenk, M.; Palm, D.; Uzoni, A.; Grube, J.; Tsang, A. H. et al. (2019): Impact of adult attention deficit hyperactivity disorder and medication status on sleep/wake behavior and molecular circadian rhythms. In: *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 44 (7), S. 1198–1206. DOI: 10.1038/s41386-019-0327-6.

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

Czeisler, Charles A.; Duffy, Jeanne F.; Shanahan, Theresa L.; Brown, Emery N.; Mitchell, Jude F.; Rimmer, David W. et al. (1999): Stability, Precision, and Near-24-Hour Period of the Human Circadian Pacemaker. In: *Science* (VOL 284), 2177-2181.

Da Silva, Antonio Geraldo; Malloy-Diniz, Leandro Fernandes; Garcia, Marina Saraiva; Rocha, Renan (2020): Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Women. In: Joel Rennó, Gislene Valadares, Amaury Cantilino, Jeronimo Mendes-Ribeiro, Renan Rocha und Antonio Da Geraldo Silva (Hg.): *Women's Mental Health*. Cham: Springer International Publishing, S. 215–219.

Damiola, F.; Le Minh, N.; Preitner, N.; Kornmann, B.; Fleury-Olela, F.; Schibler, U. (2000): Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. In: *Genes & development* 14 (23), S. 2950–2961. DOI: 10.1101/gad.183500.

Dauvilliers, Yves; Tafti, Mehdi; Landolt, Hans Peter (2015): Catechol-O-methyltransferase, dopamine, and sleep-wake regulation. In: *Sleep medicine reviews* 22, S. 47–53.

Del Campo, Natalia; Chamberlain, Samuel R.; Sahakian, Barbara J.; Robbins, Trevor W. (2011): The roles of dopamine and noradrenaline in the pathophysiology and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder. In: *Biological psychiatry* 69 (12), e145-57. DOI: 10.1016/j.biopsych.2011.02.036.

Demontis, Ditte; Walters, Raymond K.; Martin, Joanna; Mattheisen, Manuel; Als, Thomas D.; Agerbo, Esben et al. (2019): Discovery of the first genome-wide significant risk loci for attention deficit/hyperactivity disorder. In: *Nature genetics* 51 (1), S. 63–75. DOI: 10.1038/s41588-018-0269-7.

Deutsche Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung e.V. (2019): S3 Leitlinie "Infarktbedingter kardiogener Schock - Diagnose, Monitoring, Therapie. In: *AWMF online*.

Dibner, Charna; Schibler, Ueli; Albrecht, Urs (2010): The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. In: *Annual review of physiology* 72, S. 517–549. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021909-135821.

Dunne, Eugene M.; Hearn, Lauren E.; Rose, Jonathan J.; Latimer, William W. (2014): ADHD as a risk factor for early onset and heightened adult problem severity of illicit substance use: an accelerated gateway model. In: *Addictive behaviors* 39 (12), S. 1755–1758. DOI: 10.1016/j.addbeh.2014.07.009.

Durmuş, Fatma Benk; Arman, Ayşe Rodopman; Ayaz, Ayşe Burcu (2017): Chronotype and its relationship with sleep disorders in children with attention deficit hyperactivity disorder. In: *Chronobiology international* 34 (7), S. 886–894. DOI: 10.1080/07420528.2017.1329207.

Eban-Rothschild, Ada; Appelbaum, Lior; Lecea, Luis de (2018): Neuronal Mechanisms for Sleep/Wake Regulation and Modulatory Drive. In: *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 43 (5), S. 937–952. DOI: 10.1038/npp.2017.294.

Eiden, Lee E.; Weihe, Eberhard (2011): VMAT2: a dynamic regulator of brain monoaminergic neuronal function interacting with drugs of abuse. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1216 (1), S. 86–98. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05906.x.

Faltraco, Frank; Palm, Denise; Uzoni, Adriana; Simon, Frederick; Tucha, Oliver; Thome, Johannes (2021): Atomoxetine and circadian gene expression in human dermal fibroblasts from study participants with a diagnosis of attention-deficit hyperactivity disorder. In: *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* 128 (7), S. 1121–1133. DOI: 10.1007/s00702-021-02373-5.

Faltraco, Frank; Uzoni, Adriana; Shevchuk, Liliia; Thome, Johannes; Palm, Denise (2023): Synchronization of Fibroblasts Ex Vivo in Psychopharmacology. In: *Pharmacopsychiatry* 56 (3), S. 101–107. DOI: 10.1055/a-1151-4947.

Faraone, Stephen V. (2018): The pharmacology of amphetamine and methylphenidate: Relevance to the neurobiology of attention-deficit/hyperactivity disorder and other psychiatric comorbidities. In: *Neuroscience and biobehavioral reviews* 87, S. 255–270. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2018.02.001.

- Faraone, Stephen V.; Asherson, Philip; Banaschewski, Tobias; Biederman, Joseph; Buitelaar, Jan K.; Ramos-Quiroga, Josep Antoni et al. (2015): Attention-deficit/hyperactivity disorder. In: *Nature reviews. Disease primers* 1, S. 15020. DOI: 10.1038/nrdp.2015.20.
- Faraone, Stephen V.; Perlis, Roy H.; Doyle, Alys E.; Smoller, Jordan W.; Goralnick, Jennifer J.; Holmgren, Meredith A.; Sklar, Pamela (2005): Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. In: *Biological psychiatry* 57 (11), S. 1313–1323. DOI: 10.1016/j.biopsych.2004.11.024.
- Farzam, K.; Kidron, A.; Lakhar, A. D. (2022): *Adrenergic Drugs*. Hg. v. Stat Pearls. Treasure Islands (FL): Stat Pearls Publishing. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534230/>, zuletzt aktualisiert am 2022, zuletzt geprüft am 28.06.2023.
- Fayyad, J.; Graaf, R. de; Kessler, R.; Alonso, J.; Angermeyer, M.; Demyttenaere, K. et al. (2007): Cross-national prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder. In: *British Journal of Psychiatry*, S. 402–409.
- Foster, Russell G.; Kreitzman, Leon (2014): The rhythms of life: what your body clock means to you! In: *Experimental physiology* 99 (4), S. 599–606. DOI: 10.1113/expphysiol.2012.071118.
- Gau, Susan S. F.; Kessler, Ronald C.; Tseng, Wan-Ling; Wu, Yu-Yu; Chiu, Yen-Nan; Yeh, Chin-Bin; Hwu, Hai-Gwo (2007): Association between sleep problems and symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder in young adults. In: *Sleep* 30 (2), S. 195–201. DOI: 10.1093/sleep/30.2.195.
- Griefahn, Barbara; Künemund, Christa; Bröde, Peter; Mehnert, Peter (2001): Zur Validität der deutschen Übersetzung des Morningness-Eveningness-Questionnaires von Horne und Östberg. In: *Somnologie - Schlafforschung und Schlafmedizin* (5), S. 71–80.
- Guo, Shiyi; Huang, Jinsha; Jiang, Haiyang; Han, Chao; Li, Jie; Xu, Xiaoyun et al. (2017): Restless Legs Syndrome: From Pathophysiology to Clinical Diagnosis and Management. In: *Frontiers in aging neuroscience* 9, S. 171. DOI: 10.3389/fnagi.2017.00171.
- Halberg, Franz; Stephens, Aubrey N. (1959): Susceptibility to Ouabain and Physiologic Circadian Periodicity. In: *Journal of the Minnesota Academy of Science* 27 (1), S. 139–143.
- Hauser, J. M.; Azzam, J. S.; Kasi, A. (2022): *Antiemetic Medications*. Hg. v. StatPearls. Treasure Islands (FL): Stat Pearls Publishing. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532303/>, zuletzt geprüft am 28.06.2023.

- Hirsh, Jay; Riemensperger, Thomas; Coulom, Hélène; Iché, Magali; Coupar, Jamie; Birman, Serge (2010): Roles of Dopamine in Circadian Rhythmicity and Extreme Light Sensitivity of Circadian Entrainment. In: *Current Biology* 20 (3), S. 209–214. DOI: 10.1016/j.cub.2009.11.037.
- Honma, Sato; Kawamoto, Takeshi; Takagi, Yumiko; Fujimoto, Katsumi; Sato, Fuyuki; Noshiro, Mitsuhide et al. (2002): Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. In: *Nature* 419 (6909), S. 841–844. DOI: 10.1038/nature01123.
- Hood, Suzanne; Cassidy, Pamela; Cossette, Marie-Pierre; Weigl, Yuval; Verwey, Michael; Robinson, Barry et al. (2010): Endogenous dopamine regulates the rhythm of expression of the clock protein PER2 in the rat dorsal striatum via daily activation of D2 dopamine receptors. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30 (42), S. 14046–14058. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2128-10.2010.
- Horne, J. A.; Ostberg, O. (1977): Individual differences in human circadian rhythms. In: *Biological psychology* 5 (3), S. 179–190. DOI: 10.1016/0301-0511(77)90001-1.
- Huang, Jian; Zhong, Zhaomin; Wang, Mingyong; Chen, Xifeng; Tan, Yicheng; Zhang, Shuqing et al. (2015): Circadian modulation of dopamine levels and dopaminergic neuron development contributes to attention deficiency and hyperactive behavior. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35 (6), S. 2572–2587. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2551-14.2015.
- Husse, J.; Leliavski, A.; Oster, H. (2013): Zirkadiane Uhren in Gehirn und Peripherie: biologische Funktion und Relevanz für die Klinik. In: *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 138 (10), S. 493–496. DOI: 10.1055/s-0032-1332901.
- Ide, Soichiro; Ikekubo, Yuiko; Hua, Jennifer; Takamatsu, Yukio; Uhl, George R.; Sora, Ichiro; Ikeda, Kazutaka (2018): Reward-enhancing effect of methylphenidate is abolished in dopamine transporter knockout mice: A model of attention-deficit/hyperactivity disorder. In: *Neuropsychopharmacology reports* 38 (3), S. 149–153. DOI: 10.1002/npr2.12020.
- Imbesi, M.; Yildiz, S.; Dirim Arslan, A.; Sharma, R.; Manev, H.; Uz, T. (2009): Dopamine receptor-mediated regulation of neuronal “clock” gene expression. In: *Neuroscience* 158 (2), S. 537–544. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.10.044.
- Kálmán, S.; Garbett, K. A.; Janka, Z.; Mirnics, K. (2016): Human dermal fibroblasts in psychiatry research. In: *Neuroscience* 320, S. 105–121. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2016.01.067.

- Kato, Yukio; Kawamoto, Takeshi; Fujimoto, Katsumi; Noshiro, Mitsuhide (2014): DEC1/STRA13/SHARP2 and DEC2/SHARP1 coordinate physiological processes, including circadian rhythms in response to environmental stimuli. In: *Current topics in developmental biology* 110, S. 339–372. DOI: 10.1016/B978-0-12-405943-6.00010-5.
- Kelly, M. J. (1983): Indirect sympathomimetic activity of dopamine. In: *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (35), S. 330–331.
- Kessler, Ronald (2006): The Prevalence and Correlates of Adult ADHD in the United States: Results From the National Comorbidity Survey Replication. In: *Am J Psychiatry* 163 (4), S. 716. DOI: 10.1176/appi.ajp.163.4.716.
- Kessler, Ronald C.; Berglund, Patricia; Demler, Olga; Jin, Robert; Merikangas, Kathleen R.; Walters, Ellen E. (2005): Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. In: *Archives of general psychiatry* 62 (6), S. 593–602. DOI: 10.1001/archpsyc.62.6.593.
- Kim, Mikyung; Custodio, Raly James; Botanas, Chrislean Jun; La Peña, June Bryan de; Sayson, Leandro Val; Abiero, Arvie et al. (2019): The circadian gene, *Per2*, influences methamphetamine sensitization and reward through the dopaminergic system in the striatum of mice. In: *Addiction biology* 24 (5), S. 946–957. DOI: 10.1111/adb.12663.
- Klaus, Kristel; Pennington, Kyla (2019): Dopamine and Working Memory: Genetic Variation, Stress and Implications for Mental Health. In: *Current topics in behavioral neurosciences* 41, S. 369–391. DOI: 10.1007/7854_2019_113.
- Klein, Marianne O.; Battagello, Daniella S.; Cardoso, Ariel R.; Hauser, David N.; Bittencourt, Jackson C.; Correa, Ricardo G. (2019): Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. In: *Cellular and molecular neurobiology* 39 (1), S. 31–59. DOI: 10.1007/s10571-018-0632-3.
- Koerts, Janneke; Bangma, Dorien F.; Fuermaier, Anselm B. M.; Mette, Christian; Tucha, Lara; Tucha, Oliver (2021): Financial judgment determination in adults with ADHD. In: *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* 128 (7), S. 969–979. DOI: 10.1007/s00702-021-02323-1.
- Konopka, R. J.; Benzer, S. (1971): Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68 (9), S. 2112–2116. DOI: 10.1073/pnas.68.9.2112.
- Kooij, J. J.; Middelkoop, H. A.; van Gils, K.; Buitelaar, J. K. (2001): The effect of stimulants on nocturnal motor activity and sleep quality in adults with ADHD: an open-label case-

control study. In: *The Journal of clinical psychiatry* 62 (12), S. 952–956. DOI: 10.4088/jcp.v62n1206.

Kooij, J. J. Sandra; Francken, M. H. (2010): DIVA 2.0. Diagnostisches Interview für ADHS bei Erwachsenen (DIVA). Hg. v. DIVA Foundation. Den Haag, Niederlande. Online verfügbar unter <https://de.scribd.com/document/539556778/German-Diva-2-0-Diagnostisches-Interview-fur-ADHS-bei-Erwachsenen-DIVA#>, zuletzt geprüft am 10.06.2023.

Lee, Min Young; Heo, Jung Sun; Han, Ho Jae (2006): Dopamine regulates cell cycle regulatory proteins via cAMP, Ca(2+)/PKC, MAPKs, and NF-kappaB in mouse embryonic stem cells. In: *Journal of cellular physiology* 208 (2), S. 399–406. DOI: 10.1002/jcp.20674.

Leffa, Douglas Teixeira; Caye, Arthur; Rohde, Luis Augusto (2022): ADHD in Children and Adults: Diagnosis and Prognosis. In: *Current topics in behavioral neurosciences* 57, S. 1–18. DOI: 10.1007/7854_2022_329.

LeWitt, Peter A. (2015): Levodopa therapy for Parkinson's disease: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. In: *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 30 (1), S. 64–72. DOI: 10.1002/mds.26082.

Li, Si-Yue; Wang, Ya-Li; Liu, Wen-Wen; Lyu, Dong-Jun; Wang, Fen; Mao, Cheng-Jie et al. (2017): Long-term Levodopa Treatment Accelerates the Circadian Rhythm Dysfunction in a 6-hydroxydopamine Rat Model of Parkinson's Disease. In: *Chinese medical journal* 130 (9), S. 1085–1092. DOI: 10.4103/0366-6999.204920.

Li, Ye; Cassone, Vincent M. (2015): Clock-Controlled Regulation of the Acute Effects of Norepinephrine on Chick Pineal Melatonin Rhythms. In: *Journal of biological rhythms* 30 (6), S. 519–532. DOI: 10.1177/0748730415607060.

Lima, Leonardo Henrique Ribeiro Graciani de; Santos, Kátia Pereira dos; Lauro Castrucci, Ana Maria de (2011): Clock genes, melanopsins, melatonin, and dopamine key enzymes and their modulation by light and glutamate in chicken embryonic retinal cells. In: *Chronobiology international* 28 (2), S. 89–100. DOI: 10.3109/07420528.2010.540685.

Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. In: *Methods* 25, S. 402–408, zuletzt geprüft am 20.01.2023.

Lopez-Molina, L.; Conquet, F.; Dubois-Dauphin, M.; Schibler, U. (1997): The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences

- circadian behavior. In: *The EMBO journal* 16 (22), S. 6762–6771. DOI: 10.1093/emboj/16.22.6762.
- MacGregor, D. A.; Smith, T. E.; Prielipp, R. C.; Butterworth, J. F.; James, R. L.; Scuderi, P. E. (2000): Pharmacokinetics of dopamine in healthy male subjects. In: *Anesthesiology* 92 (2), S. 338–346. DOI: 10.1097/00000542-200002000-00013.
- McHugh, Patrick C.; Buckley, David A. (2015): The Structure and Function of the Dopamine Transporter and its Role in CNS Diseases. In: *Hormones and Transport Systems*, Bd. 98: Elsevier (Vitamins & Hormones), S. 339–369.
- Medin, T.; Rinholm, J. E.; Owe, S. G.; Sagvolden, T.; Gjedde, A.; Storm-Mathisen, J.; Bergersen, L. H. (2013): Low dopamine D5 receptor density in hippocampus in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). In: *Neuroscience* 242, S. 11–20. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.03.036.
- Mendoza, J.; Challet, E. (2014): Circadian insights into dopamine mechanisms. In: *Neuroscience* 282, S. 230–242. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.07.081.
- Mohammadi, Mohammad-Reza; Zarafshan, Hadi; Khaleghi, Ali; Ahmadi, Nastaran; Hooshyari, Zahra; Mostafavi, Seyed-Ali et al. (2021): Prevalence of ADHD and Its Comorbidities in a Population-Based Sample. In: *Journal of attention disorders* 25 (8), S. 1058–1067. DOI: 10.1177/1087054719886372.
- Mohawk, Jennifer A.; Green, Carla B.; Takahashi, Joseph S. (2012): Central and peripheral circadian clocks in mammals. In: *Annual review of neuroscience* 35, S. 445–462. DOI: 10.1146/annurev-neuro-060909-153128.
- Nagoshi, Emi; Saini, Camille; Bauer, Christoph; Laroche, Thierry; Naef, Felix; Schibler, Ueli (2004): Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. In: *Cell* 119 (5), S. 693–705. DOI: 10.1016/j.cell.2004.11.015.
- Ohtani, Nobuyo; Goto, Tomohide; Waeber, Christian; Bhide, Pradeep G. (2003): Dopamine Modulates Cell Cycle in the Lateral Ganglionic Eminence. In: *J. Neurosci.* 23 (7), S. 2840–2850. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.23-07-02840.2003.
- Oster, Henrik; Damerow, Sebastian; Hut, Roelof A.; Eichele, Gregor (2006): Transcriptional profiling in the adrenal gland reveals circadian regulation of hormone biosynthesis genes and nucleosome assembly genes. In: *Journal of biological rhythms* 21 (5), S. 350–361. DOI: 10.1177/0748730406293053.

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

Palm, Denise; Uzoni, Adriana; Simon, Frederick; Tucha, Oliver; Thome, Johannes; Faltraco, Frank (2021): Norepinephrine influences the circadian clock in human dermal fibroblasts from study participants with a diagnosis of attention-deficit hyperactivity disorder. In: *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* 128 (7), S. 1147–1157. DOI: 10.1007/s00702-021-02376-2.

Parekh, Puja K.; Ozburn, Angela R.; McClung, Colleen A. (2015): Circadian clock genes: effects on dopamine, reward and addiction. In: *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)* 49 (4), S. 341–349. DOI: 10.1016/j.alcohol.2014.09.034.

Pezuk, Pinar; Mohawk, Jennifer A.; Yoshikawa, Tomoko; Sellix, Michael T.; Menaker, Michael (2010): Circadian organization is governed by extra-SCN pacemakers. In: *Journal of biological rhythms* 25 (6), S. 432–441. DOI: 10.1177/0748730410385204.

Poewe, Werner; Seppi, Klaus; Tanner, Caroline M.; Halliday, Glenda M.; Brundin, Patrik; Volkmann, Jens et al. (2017): Parkinson disease. In: *Nature reviews. Disease primers* 3, S. 17013. DOI: 10.1038/nrdp.2017.13.

Refinetti, Roberto (2010): Entrainment of circadian rhythm by ambient temperature cycles in mice. In: *Journal of biological rhythms* 25 (4), S. 247–256. DOI: 10.1177/0748730410372074.

Regestein, Q. R.; Monk, T. H. (1995): Delayed sleep phase syndrome: a review of its clinical aspects. In: *Am J Psychiatry* 152 (4), S. 602–608. DOI: 10.1176/ajp.152.4.602.

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

Rippa, Alexandra L.; Kalabusheva, Ekaterina P.; Vorotelyak, Ekaterina A. (2019): Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved. In: *Cells* 8 (6). DOI: 10.3390/cells8060607.

- Roth, Jerome A.; Feor, Kevin (1978): Deamination of dopamine and its 3-O-methylated derivative by human brain monoamine oxidase. In: *Biochemical Pharmacology* 27 (11), S. 1606–1608. DOI: 10.1016/0006-2952(78)90493-8.
- Sciberras, Emma; Mulraney, Melissa; Silva, Desiree; Coghill, David (2017): Prenatal Risk Factors and the Etiology of ADHD-Review of Existing Evidence. In: *Current psychiatry reports* 19 (1), S. 1. DOI: 10.1007/s11920-017-0753-2.
- Seeman, Philip (2013): Schizophrenia and dopamine receptors. In: *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 23 (9), S. 999–1009. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2013.06.005.
- Shafiullah, Shaik; Dhaneshwar, Suneela (2023): Current Perspectives on Attention-deficit Hyperactivity Disorder. In: *Current molecular medicine*. DOI: 10.2174/1566524023666230522145950.
- Snitselaar, Mark A.; Smits, Marcel G.; van der Heijden, Kristiaan B.; Spijker, Jan (2017): Sleep and Circadian Rhythmicity in Adult ADHD and the Effect of Stimulants. In: *Journal of attention disorders* 21 (1), S. 14–26. DOI: 10.1177/1087054713479663.
- Soares, Lorrayne Stephane; Alves, Ana Luiza Costa; Costa, Danielle de Souza; Malloy-Diniz, Leandro Fernandes; Paula, Jonas Jardim de; Romano-Silva, Marco Aurélio; Miranda, Débora Marques de (2021): Common Venues in Romantic Relationships of Adults With Symptoms of Autism and Attention Deficit/Hyperactivity Disorder. In: *Frontiers in psychiatry* 12, S. 593150. DOI: 10.3389/fpsyt.2021.593150.
- Sobanski, Esther; Brüggemann, Daniel; Alm, Barbara; Kern, Sebastian; Deschner, Monika; Schubert, Thomas et al. (2007): Psychiatric comorbidity and functional impairment in a clinically referred sample of adults with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). In: *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* 257 (7), S. 371–377. DOI: 10.1007/s00406-007-0712-8.
- Sobanski, Esther; Schredl, Michael; Kettler, Nina; Alm, Barbara (2008): Sleep in adults with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) before and during treatment with methylphenidate: a controlled polysomnographic study. In: *Sleep* 31 (3), S. 375–381. DOI: 10.1093/sleep/31.3.375.
- Song, Peige; Zha, Mingming; Yang, Qingwen; Zhang, Yan; Li, Xue; Rudan, Igor (2021): The prevalence of adult attention-deficit hyperactivity disorder: A global systematic review and meta-analysis. In: *Journal of global health* 11, S. 4009. DOI: 10.7189/jogh.11.04009.

- Spencer, Thomas J.; Biederman, Joseph; Madras, Bertha K.; Faraone, Stephen V.; Dougherty, Darin D.; Bonab, Ali A.; Fischman, Alan J. (2005): In vivo neuroreceptor imaging in attention-deficit/hyperactivity disorder: a focus on the dopamine transporter. In: *Biological psychiatry* 57 (11), S. 1293–1300. DOI: 10.1016/j.biopsych.2005.03.036.
- Spera, Vincenza; Maiello, Marco; Pallucchini, Alessandro; Novi, Martina; Elefante, Camilla; Dominicis, Francesco de et al. (2020): Adult attention-deficit hyperactivity disorder and clinical correlates of delayed sleep phase disorder. In: *Psychiatry research* 291, S. 113162. DOI: 10.1016/j.psychres.2020.113162.
- Sun, Z. S.; Albrecht, U.; Zhuchenko, O.; Bailey, J.; Eichele, G.; Lee, C. C. (1997): RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. In: *Cell* 90 (6), S. 1003–1011. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80366-9.
- Takashima, A. (2001): Establishment of fibroblast cultures. In: *Current protocols in cell biology* Chapter 2, Unit 2.1. DOI: 10.1002/0471143030.cb0201s00.
- Tei, H.; Okamura, H.; Shigeyoshi, Y.; Fukuhara, C.; Ozawa, R.; Hirose, M.; Sakaki, Y. (1997): Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. In: *Nature* 389 (6650), S. 512–516. DOI: 10.1038/39086.
- Tekin, Izel; Roskoski, Robert; Carkaci-Salli, Nurgul; Vrana, Kent E. (2014): Complex molecular regulation of tyrosine hydroxylase. In: *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* 121 (12), S. 1451–1481. DOI: 10.1007/s00702-014-1238-7.
- Thaben, Paul F.; Westermark, Pål O. (2016): Differential rhythmicity: detecting altered rhythmicity in biological data. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 32 (18), S. 2800–2808. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw309.
- Thermo Fisher Scientific (2025): Thermo Fisher Scientific - Life Sciences. Produktbeschreibungen. Online verfügbar unter <https://www.thermofisher.com/de/de/home.html>, zuletzt geprüft am 21.06.2025.
- van Veen, Maaïke M.; Kooij, J. J. Sandra; Boonstra, A. Marije; Gordijn, Marijke C. M.; van Someren, Eus J. W. (2010): Delayed circadian rhythm in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder and chronic sleep-onset insomnia. In: *Biological psychiatry* 67 (11), S. 1091–1096. DOI: 10.1016/j.biopsych.2009.12.032.
- Vermeulen, Katrien; van Bockstaele, Dirk R.; Berneman, Zwi N. (2003): The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. In: *Cell proliferation* 36 (3), S. 131–149. DOI: 10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x.

- Volkow, Nora D.; Wang, Gene-Jack; Fowler, Joanna S.; Ding, Yu-Shin (2005): Imaging the effects of methylphenidate on brain dopamine: new model on its therapeutic actions for attention-deficit/hyperactivity disorder. In: *Biological psychiatry* 57 (11), S. 1410–1415. DOI: 10.1016/j.biopsych.2004.11.006.
- Volkow, Nora D.; Wang, Gene-Jack; Kollins, Scott H.; Wigal, Tim L.; Newcorn, Jeffrey H.; Telang, Frank et al. (2009): Evaluating Dopamine Reward Pathway in ADHD. In: *JAMA* 302 (10), S. 1084. DOI: 10.1001/jama.2009.1308.
- Wajszilber, Dafna; Santiseban, José Arturo; Gruber, Reut (2018): Sleep disorders in patients with ADHD: impact and management challenges. In: *Nature and science of sleep* 10, S. 453–480. DOI: 10.2147/NSS.S163074.
- Walker, William H.; Walton, James C.; DeVries, A. Courtney; Nelson, Randy J. (2020): Circadian rhythm disruption and mental health. In: *Translational psychiatry* 10 (1), S. 28. DOI: 10.1038/s41398-020-0694-0.
- Wang, Zhixiang (2022): Cell Cycle Progression and Synchronization: An Overview. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2579, S. 3–23. DOI: 10.1007/978-1-0716-2736-5_1.
- Welsh, David K.; Yoo, Seung-Hee; Liu, Andrew C.; Takahashi, Joseph S.; Kay, Steve A. (2004): Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. In: *Current biology : CB* 14 (24), S. 2289–2295. DOI: 10.1016/j.cub.2004.11.057.
- Wender, P. H.; Wolf, L. E.; Wasserstein, J. (2001): Adults with ADHD. An overview. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 931, S. 1–16.
- Willcutt, Erik G. (2012): The prevalence of DSM-IV attention-deficit/hyperactivity disorder: a meta-analytic review. In: *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 9 (3), S. 490–499. DOI: 10.1007/s13311-012-0135-8.
- Wittchen, Hans-Ulrich; Zaudig, Michael; Fydrich, Thomas (1997): SKID Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV. Achse I und II. In: *Zeitschrift für Klinische Psychologie und Psychotherapie* 28 (1), S. 68–70. DOI: 10.1026//0084-5345.28.1.68.
- Woldman, Irina; Reither, Harald; Kattinger, Alexandra; Hornykiewicz, Oleh; Pifl, Christian (2005): Dopamine inhibits cell growth and cell cycle by blocking ribonucleotide reductase. In: *Neuropharmacology* 48 (4), S. 525–537. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2004.11.013.
- Wynchank, Dora; Bijlenga, Denise; Beekman, Aartjan T.; Kooij, J. J. Sandra; Penninx, Brenda W. (2017): Adult Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) and Insomnia:

an Update of the Literature. In: *Current psychiatry reports* 19 (12), S. 98. DOI: 10.1007/s11920-017-0860-0.

Yagita, K.; Tamanini, F.; van der Horst, G. T.; Okamura, H. (2001): Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. In: *Science* 292 (5515), S. 278–281. DOI: 10.1126/science.1059542.

Yamaguchi, S.; Mitsui, S.; Yan, L.; Yagita, K.; Miyake, S.; Okamura, H. (2000): Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. In: *Molecular and cellular biology* 20 (13), S. 4773–4781. DOI: 10.1128/MCB.20.13.4773-4781.2000.

Yamamoto, Takuro; Nakahata, Yasukazu; Tanaka, Masami; Yoshida, Mayumi; Soma, Haruhiko; Shinohara, Kazuyuki et al. (2005): Acute physical stress elevates mouse period1 mRNA expression in mouse peripheral tissues via a glucocorticoid-responsive element. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (51), S. 42036–42043. DOI: 10.1074/jbc.M509600200.

Yang, S.; van Dongen, H. P. A.; Wang, K.; Berrettini, W.; Bućan, M. (2009): Assessment of circadian function in fibroblasts of patients with bipolar disorder. In: *Molecular psychiatry* 14 (2), S. 143–155. DOI: 10.1038/mp.2008.10.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zählkammer Neubauer improved, eigene Darstellung nach NanoEnTek	22
Abbildung 2: Plattenbelegung am Beispiel HDF-K07 0 μ M Dopamin für Rpl13A und Bmal1	27
Abbildung 3: Amplifikationskurve von Clock bei HDF-P12 mit 1 und 10 μ M Dopamin (RFU = Relative Fluoreszenzeinheiten).....	28
Abbildung 4: Schmelzkurve von Clock bei HDF-P12 mit 1 und 10 μ M Dopamin.....	29
Abbildung 5: Schmelzpeak von Clock bei HDF-P12 mit 1 und 10 μ M Dopamin	30
Abbildung 6: Zellkulturen HDF-P21 Passage (p) 7 (ADHS,links) und HDF-K01 p7 (HC,rechts)mit 0 μ M Dopamin; 100-fache Vergrößerung	33
Abbildung 7: Zellkulturen nach 24 h Inkubation mit 1 μ M Dopamin; HDF-P21 p7 (ADHS, links), HDF-K01 p7 (HC, rechts); 100-fache Vergrößerung	34
Abbildung 8: Zellkulturen nach 24 h Inkubation mit 10 μ M Dopamin; HDF-P21 p7 (ADHS, links), HDF-K01 p7 (HC, rechts); 100-fache Vergrößerung	34
Abbildung 9: Relative Genexpression von Clock, Bmal1 und Cry1 im Verlauf von 28 h nach Inkubation mit Dopamin in den Konzentrationen 0, 1 und 10 μ M. **p < 0,01	36
Abbildung 10: Relative Genexpression von Per1, Per2 und Per3 im Verlauf von 28 h nach Inkubation mit Dopamin in den Konzentrationen 0, 1 und 10 μ M. *p < 0,05, **p < 0,01....	38
Abbildung 11: Relative Genexpression der ADHS-Gruppe (0, 1, 10 μ M Dopamin) und Kontrollgruppe ohne Dopamin	39
Abbildung 12: Relative Genexpression mit SD von Clock, Bmal1 und Cry1 im Verlauf von 28 h nach Inkubation mit Dopamin in den Konzentrationen 0, 1 und 10 μ M. **p < 0,01	46
Abbildung 13: Relative Genexpression mit SD von Per1, Per2 und Per3 im Verlauf von 28 h nach Inkubation mit Dopamin in den Konzentrationen 0, 1 und 10 μ M. *p < 0,05, **p < 0,01	47
Abbildung 14: Relative Genexpression (mit SD) der ADHS-Gruppe (0, 1, 10 μ M Dopamin) und Kontrollgruppe ohne Dopamin. *p < 0,05, ***p > 0,001	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kriterien zur Klassifikation der ADHS modifiziert nach DSM-V (American Psychiatric Association 2013).....	4
Tabelle 2: Zellkulturmedien und -lösungen	17
Tabelle 3: Chemikalien und Kits für die RNA-Isolation, cDNA-Synthese und qRT-PCR ...	17
Tabelle 4: qRT-PCR-Oligonukleotide	18
Tabelle 5: Sonstige Materialien (Geräte)	18
Tabelle 6: Ergebnisse der psychometrischen Tests; * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$	32
Tabelle 7: Ergebnisse des D-MEQ (Chronotypen)	32
Tabelle 8: Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der relativen Genexpression für signifikante Zeitpunkte	49

Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibiotikum
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung
ANOVA	Analysis of Variance = Varianzanalyse
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
BMAL1	Brain and muscle, ARNT-like protein 1
BMI	Body-Mass-Index
ca.	circa
CAARS	Conners Adult ADHD Rating Scale
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLOCK	Circadian locomotor output cycles kaput
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CRY	Cryptochrome
C _T	Threshold Cycle
DAT1	Dopamintransporter 1
DBP	D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein
DEC1/2	Differentiated embryo chondrocyte expressed gene 1/2
d.h.	das heißt
DIVA 2.0	Diagnostisches Interview für ADHS bei Erwachsenen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
D-MEQ	Morningness-eveningness questionnaire (deutsche Version)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPA	Dihydroxyphenylalanin

DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (4. Auflage)
DSM-5	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (5. Auflage)
DSPD	Delayed Sleep Phase Disorder (verzögertes Schlafphasensyndrom)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
etc.	et cetera
FBS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
ggf.	gegebenenfalls
HC	Healthy Controls = Kontrollpersonen ohne neuropsychiatrische Erkrankung
HDF	humane dermale Fibroblasten
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (10. Version)
IQ	Intelligenzquotient
MAO	Monoaminoxidase
MAPK	Mitogen activated protein kinase
M. Parkinson	Morbus Parkinson
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
MWT	Mehrfachwahl-Wortschatz-Intelligenztest
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PER	Period
PSQI	Pittsburgh Sleep Quality Index
qRT-PCR	Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion

RAR	Retinoic acid receptor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROR α	RAR-related orphan receptor alpha
RORE	retinoic acid-related orphan receptor response element-binding site
Rpl13a	Ribosomal protein L13a
Rpl19a	Ribosomal protein L19a
rpm	Rounds per minute
SCN	Nucleus suprachiasmaticus
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SKID	Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolettstrahlung
VMAT2	Vesicular monoamine transporter 2
WURS-k	Wender Utah Rating Scale (Kurzform)
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
ZT	Zeitgeber-Time
ZT0	Beginn des Tages/helle Phase
ZT12	Beginn der Nacht/dunkle Phase

Thesen

1. ADHS ist eine der häufigsten neuropsychiatrischen Erkrankungen im Kindesalter und bleibt oft bis ins Erwachsenenalter erhalten.
2. Die zirkadiane Rhythmik von Patienten*innen mit einer ADHS-Diagnose unterscheidet sich von Kontrollpersonen. ADHS-Patienten*innen gehören überwiegend den späteren Chronotypen an.
3. Ein zirkadianer Rhythmus, der nicht an gesellschaftlich vorgegebene Tagesabläufe angepasst ist, kann zu Schlafproblemen nachts sowie Müdigkeit und Unaufmerksamkeit tagsüber führen und dadurch ADHS-Symptome verstärken.
4. Humane dermale Fibroblasten (HDF) eignen sich als Zellmodell zur Untersuchung der zirkadianen Rhythmik, da sie auch außerhalb vom Körper einen stabilen Rhythmus der zirkadianen Genexpression zeigen und Faktoren wie Chronotyp und Medikamenteneinfluss erhalten bleiben.
5. Die zirkadianen Gene *Clock*, *Bmal1*, *Per1-3*, *Cry1* sind wesentliche Komponenten der zirkadianen Rhythmik und regulieren sich gegenseitig durch Transkriptions-Translations-Rückkopplungsschleifen. Ihre Konzentration in der Zelle schwankt im Tagesverlauf nach einem jeweils typischen Muster.
6. Dopamin beeinflusst die zirkadiane Genexpression.
7. Zirkadiane Gene haben Einfluss auf Enzyme und Proteine, die mit dem Dopaminhaushalt verbunden sind.
8. Die zirkadiane Genexpression der HDF von Patienten*innen mit einer ADHS-Diagnose und Kontrollpersonen ohne neuropsychiatrische Erkrankung unterscheidet sich.
9. Dopamininkubation humaner dermaler Fibroblasten führt zu keiner Veränderung der *Per3*-Expression bei Kontrollpersonen, führt aber zu einer signifikanten Änderung bei ZT24 und ZT28 in der ADHS-Gruppe.
10. Dopamin hat unterschiedliche Effekte auf die Expression von zirkadianen Genen in der ADHS-Gruppe und der Kontrollgruppe zu haben. So sorgt Dopamininkubation z.B. bei *Cry1* ZT28 bei ADHS-Patienten*innen für eine erhöhte, bei Kontrollpersonen für eine verminderte Genexpression.
11. In der ADHS-Gruppe führt die Inkubation von HDF mit 1 μ M und 10 μ M Dopamin zu einer Anpassung der *Per2*- und *Per3*-Expression an den Verlauf bei Kontrollpersonen.

12. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass durch Beeinflussung des Dopaminhaushalts die Schlafqualität sowie ADHS-Symptome durch Anpassung der zirkadianen Genexpression, besonders von *Per2* und *Per3*, verbessert werden könnte.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die eingereichte Promotionsschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock,

Lena Borchert

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. Johannes Thome für die Überlassung des spannenden Dissertationsthemas danken. Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. med. Frank Faltraco für die engagierte Betreuung und die stets konstruktive Unterstützung während der gesamten Promotionszeit.

Für die umfassende Einarbeitung und tatkräftige Unterstützung im Labor möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. rer. nat. Denise Palm und Frau Adriana Uzoni bedanken. Ebenso danke ich der gesamten Arbeitsgruppe für die kollegiale Atmosphäre, den fachlichen Austausch und die jederzeit hilfsbereite Zusammenarbeit.

Nicht zuletzt danke ich meinen Freunden, meiner Familie und Tim für ihre beständige Unterstützung, Geduld und Motivation vor allem im Schreibprozess. Eure Ermutigung hat mir sehr geholfen.

Publikation

Faltraco, Frank; Palm, Denise; Uzoni, Adriana; Borchert, Lena; Simon, Frederick; Tucha, Oliver; Thome, Johannes (2021): Dopamine adjusts the circadian gene expression of *Per2* and *Per3* in human dermal fibroblasts from ADHD patients. In: *Journal of Neural Transmission* 128, S. 1135–1145. DOI: 10.1007/s00702-021-02374-4.