

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie der

Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Jürgen Deckert

Methylphenidat-induzierte Genexpression in lymphoblastoiden Zellen von adulten ADHS Patienten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von

Ricarda Schwarz

aus Hildesheim

Würzburg, Januar 2016

Referent:

Prof. Dr. med. A. Reif

Korreferent:

Prof. Dr. med. M. Romanos

Dekan:

Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

22.09.2016

Die Promovendin ist Ärztin

Abkürzungen

ABI	Ankle Brachial Index
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AD	Alzheimer Disease
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom
AGS	Activator of G-protein signaling
ALAS	Aminolävulinat, delta-, synthase 1
ANOVA	Analysis of variance
APP	Amyloid Precursor Protein
ASD	Autism Spectrum Disorder
ATF	Aktivator Protein Komponente
ATXN	Ataxin
B2M	beta-2-microglobulin
BALF	EBV-encoded glycoprotein gp 110
Bcl-2	B-cell-lymphoma 2
bHLH	basic Helix loop helix
BMI	Body-mass-Index
Bp	Basenpaare
C(t)	reshold cycle (Schwelle)
Ca	Calcium
CA3	Cornu ammonis
CAARS	Conners' Adult ADHD Rating Scales
CAG	Cytidin-Adenin-Guanin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBV	Cerebelläre Vermis
CCD	charged coupled device= ladungsgekoppeltes Bauteil
CCT η	Chaperonin-containing-T-complex Polypeptid
CD	cluster of differentiation
Cdk	cyclin dependent kinase
cdNA	complementary DNA
cGK	zyklische Guanylatcyklase
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CH	Calponin ähnliche Domäne
CHOP	Chemotherapieschema
COOH	Carboxylgruppe
CREB	cAMP-responsive element binding protein
CRF	Corticoliberin
CT	reshold cycle (Schwelle)
C-Terminus	Carboxy-Ende
CTRL	Control
CUMS	chronic unpredictable mild stress
D2, D4, DRD	Dopaminrezeptoren 2, 4

DA	Dopamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DAT	Dopamintransporter
dATP	desoxyAdenosintrisphosphat
DBH	Dopamin Beta Hydroxylase
dCTP	desoxyCytidintrisphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	desoxyGuanosintrisphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS/ DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSM-TR	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - Text revision
dT	desoxy Thymidin
dTTP	desoxyThymidintrisphosphat
E2F	eucaryotic transcription factor 2
EBNA	EBV-Nuclear-Antigen
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
ELK	eag like channel
EndMT	endothelial-to-mesenchymal-transition
eNOS	endotheliale NOS
ERK	extracellular regulated MAP kinase
EtBr	Ethidiumbromid
EVA	Ethylenvinylacetat
Eλ	Extinktionskoeffizient
F	Female
FADD	Fas-associated death domain protein
FBS	fetales Rinderkalbsserum (fetal bovine serum)
FDR	False discovery rate
G1	Lücke, gap
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
gDNA	genomische DNA
Geb	Geburtsdatum
GH	Growth Hormon
<i>GLUT3</i>	Glukosetransporter 3
GSC	Glasgow Coma Scale
GS-well	gel-stain
GTP	Guanosintriphosphat
<i>GUCY1B3</i>	guanylate cyclase 1, soluble, beta 3
GUSB	glucuronidase beta
G-well	Gel
HBA1c	glykosyliertes Hämoglobin

HDAC	Histondeacetylase
<i>HEY1</i>	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1
hOGG1	8-hydroxyguanine glycosylase 1
HPRT	hypoxanthine phosphoribosyltransferase
Hsp	Hitzeschockprotein
HTR1B	Serotonin 1B-Rezeptor
HTT	Serotoninrezeptor
HWZ	Halbwertszeit
ICD	International Classification of Diseases
IL	Interleukin
iNOS	intrazelluläre NOS
IQ	Intelligenzquotient
IRC	Interruncalibrator
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
iTaq	<i>Thermus aquaticus</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase, Januskinase
Kb	kilo Basen
kDa	kilo Dalton
LANP	leucine-rich acidic nuclear protein
L-Arg	L-Arginin
LGN	Leu-Gly-Asn= Leucin-Glycin-Aparagin
LIMMA	Linear Models Microarray
LMP	latentes Membranprotein (Latency Membran Protein)
M	Male
<i>MAP3K8</i>	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8
Max	MYC associated factor X
MEF	makrolid efflux protein
MEK	MAP-Kinase Erk Kinase
Meth	Methamphetamine
MiniDips	Diagnostische Interview bei psychischen Störungen
miRNA	micro RNA
mM	Mikromolar
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MPH	Methylphenidat
mRNA	messenger RNA
MSY1	Mykoplasma Synoviae
NAV	neuron navigator
nf Sp1/Sp3	nuclear factor specificity protein
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NGFI-B	nerve growth factor induced protein B
NICD	intrazellulär konstitutiv aktivierte Notch Domäne
NK	Natürliche Killerzellen
NMDA	N-methyl-D-Aspartat

nNOS	neuronale NOS
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthetase
NRC	no reverse control
nRT	nicht Reverse Transkriptase
nTC	no template control
N-Terminus	Stickstoff-Ende
OD	optische Dichte
ODQ	Oxadiazoloquinoxalin
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	polymerase chain reaction
pCREB	phosphoryliertes cAMP-responsive element binding protein
PDE	Phosphodiesterase
PFC	Präfrontaler Cortex
PI	Phosphatidylinositol
PKA	Proteinkinase A
POMC	Proopiomelanocortin
Ppi	Pyrophosphat
PPI	Prepulse Inhibition
pRB	hypophosphoryliertes Retinoblastomprotein
QC	Quebec
qPCR	quantitative PCR
RA	retinoic acid
RAINB1	retinoid-acid-induced in neuroblastoma 1
RBPJ	recombination signal sequence-binding protein
RFU	Relative fluorescence unit
RIG	retinoic acid inducible gene
RIN	RNA integrity number
RMA	Robust Multi Array Average
RNA	Ribonucleic acid
ROR α	related orphan receptor
Rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RQI	RNA Quality Index
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
S	Svedberg Sedimentationskonstante
S	Standardabweichung
Sap	sporulation associated protein
SCA1	spinocerebelläre Ataxie Gen 1
SDHA	succinate dehydrogenase complex, subunit A

SEM	standard error of the mean
sGC	lösliche Guanylatcyclase
SH	small hydrophobic
Sigma σ	Signifikanz
siRNA	small interfering RNA
SK	Probenabkürzung von Sarah Kittel
SLC2A3	Solute carrier
SMRTER	Retinoid- und Tyroidrezeptoren
SNP	small nuclear polymorphism
SNAP25	Synapsen assoziierter Protein 25
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
Std. Dev.	Standard deviation
TAE	Tris Acetat EDTA Puffer
TAQ	Thermus aquaticus
TATA-Box	DANN-Region mit Thymin-Adenin
TBP	TATA box binding protein
TFRC	transferrin receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TRADD	TNFR-associated death domain protein
TRAF	TNF-receptor-associated factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan
Tx	Zeitpunkt x
U	Units
U	Unknown
Unc	uncortin precursor
UTR	untranslated region
UV	ultraviolettes Licht
UV/Vis	ultra violette/ visible (light)
VNTR	variable number of tandem repeats
VSN	Variance stabilizing normalization
w/v	Massenprozent (weight)/ Volumenprozent (volume)
WPW	Wolff-Parkinson-White-Syndrom
WURS	Wender Utah Rating Scale
YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom.....	1
1.1.1 Geschichte und Epidemiologie	2
1.1.2 Klassifikation	3
1.1.1 Molekularbiologie und Pharmakotherapie	5
1.2 Methylphenidat	5
1.3 Fragestellung.....	6
2 Material und Methoden	8
2.1 Material	8
2.1.1 Zelllinien.....	8
2.1.2 Synthetische Oligonukleotide.....	11
2.1.3 Reaktionskits.....	11
2.1.4 Chemikalien	12
2.1.5 Spezielle Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien.....	13
2.1.6 Geräte	14
2.1.7 Software.....	15
2.2 Methoden	16
2.2.1 Isolierung humaner Lymphozyten	16
2.2.2 Transformation mit Epstein-Barr-Virus.....	18
2.2.3 Herstellung des Kulturmediums	21
2.2.4 Kultivierung.....	21
2.2.5 Splitten.....	22
2.2.6 Kontamination	23
2.2.7 Kryokonservierung.....	23
2.2.8 Zellzählung und Untersuchung der Zellvitalität	25
2.2.8.1 Hämozytometer	26
2.2.8.2 Cellometer	27
2.2.9 Methylphenidat im Versuchsmodell.....	28
2.2.9.1 MPH-Halbwertszeit unter Kultivierungsbedingungen.....	29
2.2.9.2 Toxizitätstest	30
2.2.9.3 Einfluss von MPH auf Zellzahl und -größe	30
2.2.10 MPH-Inkubation	31

2.2.10.1 Zellentnahme und Zwischenlagerung	32
2.2.10.2 RNA-Extraktion	32
2.2.10.3 Konzentrationsbestimmung und Überprüfung der RNA-Qualität.....	33
2.2.10.3.1 Spektrophotometer	34
2.2.10.3.2 Gelelektrophorese	36
2.2.10.3.2.1 Herstellung eines Agarosegels.....	37
2.2.10.3.2.2 Elektrophoretische Trennung	37
2.2.10.3.2.3 Visualisierung mit <i>ChemiDoc</i>	39
2.2.10.3.2.4 Automatisierte Gelelektrophorese.....	40
2.2.10.3.2.5 Bioanalyser	43
2.2.10.4 Micro Array	43
2.2.10.5 cDNA-Synthese	46
2.2.10.5.1 Überprüfung der cDNA auf gDNA-Kontamination	47
2.2.10.6 Quantitative Real Time PCR.....	48
2.2.10.6.1 Primerauswahl	49
2.2.10.6.1.1 Zielgene	50
2.2.10.6.1.2 Referenzgene	50
2.2.10.6.2 Plattenbelegung.....	52
2.2.10.6.3 QRT PCR-Protokoll	53
2.2.10.6.3.1 Schmelzkurve.....	54
2.2.10.7 Datenverarbeitung und Auswertung	55
2.2.10.7.1 Probenauswahl und -aufbereitung.....	55
2.2.10.7.2 Statistische Auswertung	57
3 Ergebnisse.....	58
3.1 MPH: Pharmakokinetik und Toxizität.....	58
3.1.1 MPH Halbwertszeit unter Kulturbedingungen	58
3.1.2 MPH Toxizität	59
3.1.3 Einfluss von MPH auf Zellzahl und -größe	60
3.1.3.1 Zellzahl	61
3.1.3.2 Zellgröße	62
3.2 Genexpressionsanalyse	63
3.2.1 Microarray	64
3.2.2 Quantitative Real Time PCR.....	65
3.2.2.1 Gruppeneffekte	67

3.2.2.2 Interaktionseffekte	67
3.2.3 Auswertung der einzelnen Gene	69
3.2.3.1 <i>ATXN1</i>	70
3.2.3.2 <i>GLUT3</i>	71
3.2.3.3 <i>GUCY1B3</i>	72
3.2.3.4 <i>HEY1</i>	73
3.2.3.5 <i>MAP3K8</i>	74
3.2.3.6 <i>NAV2</i>	75
4 Diskussion	76
4.1 <i>ATXN1</i>	77
4.2 <i>GLUT3</i>	79
4.3 <i>GUCY1B3</i>	83
4.4 <i>HEY1</i>	87
4.5 <i>MAP3K8</i>	91
4.6 <i>NAV2</i>	94
4.7 Limitationen.....	95
5 Zusammenfassung	98
Anhang.....	101
RNA-Konzentrationen, Qualität und Reinheitswerte: Nano-Drop und Experion	101
Gelelektrophoresebilder.....	106
Probandendaten	107
Randomisierung der Proben.....	110
Plattenvorlagen.....	113
Plattenbelegung QRT PCR.....	114
Literaturverzeichnis	125

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Zelllinien	10
Tabelle 2: Synthetische Oligonukleotide	11
Tabelle 3: Reaktionskits	11
Tabelle 4: Chemikalien.....	12
Tabelle 5: Spezielle Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien	13
Tabelle 6: Geräte.....	14
Tabelle 7: Software	15
Tabelle 8: Probenpooling	44

Tabelle 9: Microarray-Daten	65
Tabelle 10: Real Time PCR Daten	66
Tabelle 11: RNA-Messwerte	105
Tabelle 12: Demographische und phänotypische Daten der Probande.....	107
Tabelle 13: Randomisierung der Proben	110
Tabelle 14: Plattenvorlage PCR: Platte 1.....	113
Tabelle 15: Plattenvorlage PCR: Platte 2.....	113
Tabelle 16: Zielplatte 1.....	114
Tabelle 17: Zielplatte 2.....	116
Tabelle 18: relative, normalisierte Genexpressionsdaten zu den einzelnen Zeitpunkten (tx) mit und ohne MPH	118
Tabelle 19: Genexpressionsunterschiede zwischen MPH- und Vehikelbehandlung zu den einzelnen Zeitpunkten in der ADHS Gruppe.....	121
Tabelle 20: Genexpressionsunterschiede zwischen MPH- und Vehikelbehandlung zu den einzelnen Zeitpunkten in der Kontrollgruppe	123
Abbildung 1: Leucosepröhrchen nach der Befüllung und nach der Zentrifugation (Greiner Bio One 2007).....	17
Abbildung 2: Zellzyklusregulation durch RB(Hahn 2009)	19
Abbildung 3: Einfluss von Licht und Temperatur auf die HWZ von MPH	28
Abbildung 4: Experion RNA StdSens LabChip	41
Abbildung 5: Experion: Elektropherogramm	42
Abbildung 6: cDNA.....	46
Abbildung 7: Intronüberspannender Primer	50
Abbildung 8: Real Time PCR Protokoll	53
Abbildung 9: Schmelzkurve	54
Abbildung 10: MPH-Halbwertszeitbestimmung.....	58
Abbildung 11: MPH-Toxizität	60
Abbildung 12: MPH-Einfluss auf Zellzahl	61
Abbildung 13: MPH-Einfluss auf Zellgröße	62
Abbildung 14: Microarray Heatmap	64
Abbildung 15: Genexpression vor MPH-Inkubation	67
Abbildung 16: Genexpressionswerte zu verschiedenen Zeitpunkten ohne Unterteilung in ADHS-/Kontrollgruppe	68
Abbildung 17: Interaktionseffekt Gruppen.....	69
Abbildung 18: ATXN1, Expressionsverlauf	70
Abbildung 19: GLUT3, Expressionsverlauf	71
Abbildung 20: GUCY1B3, Expressionsverlauf	72
Abbildung 21: HEY1, Expressionsverlauf	73
Abbildung 22: MAP3K8, Expressionsverlauf.....	74
Abbildung 23: NAV2, Expressionsverlauf.....	75
Abbildung 24: ATXN1 Signalweg (nach Hearst et al. 2010).	77
Abbildung 27: GUCY1B3: sGC-Signalweg.....	84
Abbildung 28: HEY1 Signalweg	88
Abbildung 29: MAP3K8-Signalweg (Zhang et al. 2013)	92

Abbildung 30: Primertest <i>ATXN1</i> , <i>GLUT3</i>	106
Abbildung 31: Primertest <i>HEY1</i> , <i>GUGY1B3</i>	106
Abbildung 32: Primertest <i>NAV2</i> , <i>B2M</i>	106
Abbildung 33: Primertest <i>TBP</i> , <i>TFRC</i>	106
Abbildung 34: Primertest <i>GUSB</i> , <i>ALAS1</i>	106
Abbildung 35: Primertest <i>SDHA2</i>	106
Abbildung 36: Primertest <i>HPRT1</i>	106
Abbildung 37: Primertest <i>YWHAZ</i>	106

1 Einleitung

1.1 Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom

*„Ob der P h i l i p p heute still
Wohl bei Tische sitzen will?“
Also sprach in ernstem Ton
Der Papa zu seinem Sohn,
Und die Mutter blickte stumm
Auf dem ganzen Tisch herum.
Doch der Philipp hörte nicht,
Was zu ihm der Vater spricht.
Er gaukelt
Und schaukelt,
Er trappelt
Und zappelt
Auf dem Stuhle hin und her.
„Philipp, das mißfällt mir sehr!“*

(Hoffmann 1845)

Auch wenn es sich bei der vorliegenden Arbeit um eine naturwissenschaftliche handelt, veranschaulicht das vorangestellte Zitat aus dem Kinderbuch *Der Struwwelpeter* des Arztes Heinrich Hoffmann (1809-1894) das Thema der Arbeit. Hier werden verschiedene Aspekte angeschnitten, die den Hintergrund der Arbeit verdeutlichen. Bei der Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS) handelt es sich um eine Erkrankung, die vor allem im Kindesalter (hier: der kleine Sohn Philipp) diagnostiziert wird. Die Kinder fallen auf, weil sie Regeln und erwarteten Verhaltensweisen (hier: still bei Tisch sitzen) des sozialen Umfelds (hier: die Eltern) nicht gerecht werden. Die Erkrankung hat also Einfluss auf die unmittelbaren Bezugspersonen (Familie und Schule), wird umgekehrt aber auch von diesen beeinflusst. So führt das Verhalten der Kinder oft zu Verzweiflung und Ratlosigkeit, aber auch Verärgerung bei ihren Eltern (hier: Die Mutter beobachtet die unerwünschte Situation und schweigt; dem Vater „missfällt“ das Verhalten). Wie der Name „Zappelphilipp“ schon verrät, ist das Kind hyperaktiv („Er gaukelt und schaukelt, Er trappelt und zappelt“) und unaufmerksam („Philipp hörte nicht,

was der Vater zu ihm spricht“). Durch „ernsten Ton“ allein, was hier wohl stellvertretend für Erziehung zu verstehen ist, lässt sich Philipps Verhalten nicht verändern.

Obwohl die Erkrankung ADHS oftmals immer noch als „Modediagnose“ bezeichnet wird, wurden die Symptome und die damit zusammenhängenden soziodynamischen Schwierigkeiten schon 1845 in Hoffmanns Kinderbuch beschrieben. Man kann also weder behaupten, dass ADHS ein neuartiges Problem des 21. Jahrhunderts darstellt noch, dass Diagnostik und Behandlungswunsch einen modernen Trend von Psychiatern oder den wachsenden Ehrgeiz von Eltern abbilden.

1.1.1 Geschichte und Epidemiologie

Wie schon angekündigt, wurden Symptome von ADHS bereits Mitte des 19. Jahrhunderts beschrieben. Von einer richtigen Diagnose kann man bei Kindern, deren Verhalten 1845 mit den Namen „Zappelphilipp“ oder „Hans Guck-in-die-Luft“ beschrieben wurde, allerdings nicht sprechen. Im DSM III von 1980 wurden erstmals genaue Kriterien zur Diagnosestellung festgelegt, erst 1987 erhielt das Syndrom im DSM-III-R die heute gebräuchliche Bezeichnung Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom (ADHS). In den Jahren zwischen 1854 und 1980 wurden die Symptome als „Hypermetamorphosis bzw. Entwicklungsstörung durch Reizüberflutung“ (Heinrich Neumann, 1859), „affektives und moralisches Irresein“ (Henry Maudsley, 1867), „Neurasthenie“ (George Miller Beard, 1869), „genetische Erkrankung“ (Hermann Emminghaus, 1878), „Konstitutioneller Charakterfehler“ (Ludwig von Strümpel, 1890), „defect in moral control“ (Frederic Still, 1902), „schwererziehbare Kinder“ (Adalbert Czerny, 1908), „minimal brain damage“ (Lempp, 1970), „hyperkinetic impulsive disorder“ (Maurice W. Lauffer, 1954), „minimal brain dysfunction“ (Conrad, 1975), „hyperkinetische Reaktion in der Kindheit oder bei Heranwachsenden“ (DSM II, 1968), „Attention Deficit Disorder“ (DSM III, 1980) bezeichnet (Seidler 2004). Daran erkennt man die unterschiedlichen Gewichtungen (Hyperkinetik vs. Einschränkung der Aufmerksamkeit) und Erklärungen (soziodynamisches Problem, genetische Erkrankung) der Symptomatik. Heute

wird die Erkrankung als polygenetisch und multifaktoriell bedingt bezeichnet. Es handelt sich also um eine Kombination aus mehreren genetischen Veränderungen und dem Einfluss von Umweltfaktoren. Die Behandlung erfolgt dementsprechend ebenfalls multimodal durch verschiedene Medikamente, Psychotherapien und Erziehungsprogramme.

Dass die Diagnose ADHS immer häufiger gestellt wird, steht sicherlich auch mit der genauen Festlegung von Diagnosekriterien 1987 im DSM-III im Zusammenhang. Nichts desto trotz ist ADHS heute die am häufigsten diagnostizierte psychiatrische Erkrankung des Kindesalters. Der Anteil der betroffenen Kinder wird auf 3-10% geschätzt, Jungen sind 2-3-mal häufiger betroffen als Mädchen (Retz and Klein 2010). Neueren Erkenntnissen zu Folge bleibt ADHS aber nicht auf das Kindesalter beschränkt. Man geht davon aus, dass bei 30-60% der Kinder mit ADHS die Symptome auch im Erwachsenenalter fortbestehen (Wender, Wolf, and Wasserstein 2001). So werden im DSM-5 im Mai 2013 erstmals auch Kriterien zur Diagnose von adultem ADHS aufgeführt.

1.1.2 Klassifikation

In der ICD-10-Klassifikation, in der ADHS entweder unter F 90.1 als *hyperkinetische Störung verbunden mit Störung des Sozialverhaltens* oder unter F 98.8 als *sonstige näher bezeichnete Verhaltens- und emotionale Störungen mit Beginn in Kindheit und Jugend* aufgeführt. An der ICD-10-Klassifikation wird kritisiert, dass sie ausschließlich die Hyperaktivität kategorisiert und das Krankheitsbild ADHS deswegen nicht vollständig erfasst (Müller, Candrian, and Kropotov 2011). Im DSM-5 (Diagnostic and Statistical Manual), dass in den USA verwendet wird, hingegen wird ADHS in drei Subtypen unterteilt: vorwiegend unaufmerksam, vorwiegend hyperaktiv und kombinierter Typ. Es gibt neun Diagnosekriterien für Hyperaktivität und Impulsivität sowie neun für Aufmerksamkeitsverhalten, von denen jeweils sechs (bei über 17-Jährigen fünf) für die Diagnosestellung erfüllt sein müssen. Die Aufmerksamkeitskriterien beziehen sich auf Konzentrationsdauer, Flüchtighkeitsfehler, Zuhören, Ausführung von Anweisungen, Vergesslichkeit, Ab-

lenkbarkeit und Arbeitsstruktur. Die Hyperaktivitäts- und Impulsivitätskriterien betreffen motorische Unruhe, ruhige Selbstbeschäftigung, Geduld, Redefluss, Hektik während Aktivitäten, voreilige Beantwortung von Fragen und Unterbrechung von Interaktionen anderer Personen. Dabei basieren die Beurteilungen auf der Befragung der Eltern und möglichst einer weiteren Bezugsperson. Die Symptome müssen über einen Zeitraum von mindestens sechs Monaten in zwei Bereichen (z.B. Schule und Zuhause) in den ersten zwölf Lebensjahren auftreten und deutliche Beeinträchtigungen hervorrufen. Andere Erkrankungen, Verletzungen und Störungen müssen ausgeschlossen sein. An diesem Modell wird kritisiert, dass emotionale Aspekte und geschlechtsspezifische Besonderheiten zu wenig berücksichtigt werden. Der größte Kritikpunkt betrifft die starke Abhängigkeit der Diagnose von den Einstufungen der Befragten, die wiederum individuellen, kulturspezifischen, philosophisch-moralischen und Beziehungsaspekten unterworfen sind. So führen Befragungen zu einem Patienten teilweise zu divergenten Aussagen. Verschiedene klinische Interviews (z.B. Wender-Utah-Rating Scale zur Erfassung der kindlichen Symptomatik und das Wender-Reimherr-Interview zur Erfassung der Symptomatik im Erwachsenenalter) und neuropsychologische Tests (z.B. d2 Aufmerksamkeitsbelastungstest oder der TAP Test (Testbatterie zur Aufmerksamkeitsprüfung)) versuchen, diese möglichen Abweichungen einzuschränken. Um eine Diagnose stellen zu können, müssen bestimmte Kriterien genau erfüllt sein bzw. eine bestimmte Punktzahl erreicht werden. Da bisher keine Biomarker bekannt sind, die eine eindeutige Diagnose ermöglichen, beruht der Behandlungsplan auf den Ergebnissen der genannten Untersuchungsmethoden. Welches Pharmakon bei einer medikamentösen Therapie gewählt und in welcher Dosierung es verschrieben wird, basiert auf den Leitlinien der Psychopharmakologie (z.B. für das Kindesalter: Leitlinie Hyperkinetische Störungen der AWMF).

1.1.1 Molekularbiologie und Pharmakotherapie

Obwohl die Heritabilität von ADHS auf bis zu 80 % geschätzt wird, konnten bislang keine dominierenden Risikogene für ADHS gefunden werden (Franke et al. 2012). Man geht vielmehr davon aus, dass das Zusammenspiel vieler Genvarianten das Risiko für ADHS beeinflusst. Vor allem Gene, die mit dem Dopamin- (*DRD4*, *DRD5*, *DAT1*, *DBH*) und Serotoninsystem (*HTR1B*, *HTT*) und generell der Transmitterfreisetzung (*SNAP25*) in Verbindung stehen, wurden mit ADHS assoziiert. In diese Systeme greifen auch die in der ADHS-Behandlung gebräuchlichen Medikamente ein. Methylphenidat und Amphetamin greifen in den Dopamin- und Noradrenalinstoffwechsel ein, Atomoxetin beeinflusst vor allem den Noradrenalinstoffwechsel. In Deutschland ist die Zulassung von Amphetaminpräparaten wie zum Beispiel *Elvanse* (Lisdexamfetamin) auf die Behandlung von Kindern beschränkt. Für die Therapie von Erwachsenen mit ADHS sind nur *Medikinet adult*[®] und *Ritalin adult*[®] (beides retardiertes Methylphenidat) zugelassen (Müller, Candrian, and Kropotov 2011, Arzneimittelrichtlinie Stimulantien, 2013)

1.2 Methylphenidat

Das unter dem Handelsnamen *Ritalin*[®] bekannte Medikament mit dem Wirkstoff Methylphenidat (MPH) wurde 1944 von Leandro Panizzon in Basel entdeckt. Auf der Suche nach einem Ersatz für die Behandlung mit Amphetaminen, deren Nebenwirkungen und Suchtpotenzial nicht unerheblich sind, synthetisierte er Methylphenidat. Da es seiner Frau Rita zu Leistungssteigerungen im Tennisspiel verhalf, erhielt es den Namen *Ritalin*. Heute wird es von der Firma Novartis vertrieben. Neben *Ritalin*[®] ist Methylphenidat auch Wirksubstanz der Handelsmarken *Medikinet*[®], *Concerta*[®] und *Focalin*[®]. Außerdem gibt es auch retardierte Formen von Methylphenidat, die eine Freisetzung des Wirkstoffes besser auf die Leistungsanforderungen abstimmen sollen und eine nur einmalige Medikamenteneinnahme am Tag erfordern (Allroggen et al. 2010). Auch wenn die genaue Wirkungsweise sowie Langzeiteffekte von Methylphenidat bislang nicht ausreichend geklärt sind, geht man davon aus, dass es die Wiederaufnahme von Dopamin in

striatalen Synapsen hemmt und dadurch eine bessere Dopaminverfügbarkeit erzielt. Außerdem soll es die Noradrenalin- und Dopaminrezeptoren der angesteuerten Neurone im Frontalhirn stimulieren (Vaidya and Stollstorff 2008).

Obwohl Methylphenidat das Mittel der Wahl bei ADHS ist, wirkt es bei etwa einem Drittel der behandelten Patienten nicht ausreichend (Müller, Candrian, and Kropotov 2011).

Die medikamentöse Behandlung von ADHS führt nicht zu einer Heilung. Eingesetzte Medikamente müssen also dauerhaft eingenommen werden. Auch wenn es keine fundierten Hinweise auf langfristige Schädigungen durch MPH-Behandlung gibt, kann man diese nicht sicher ausschließen. Die Aussage, dass MPH in Lymphozyten Chromosomenaberrationen und Mikrokernfrequenzen erhöht (El-Zein et al. 2005), konnte widerlegt werden (Walitza et al. 2010). Ein reduziertes Wachstum unter MPH-Behandlung gilt jedoch als erwiesen (Poulton et al. 2013). Nicht nur aus diesen Gründen, sondern auch wegen des illegalen Einsatzes von Methylphenidat z.B. als „Neurodoping“ in Prüfungen und vor allem wegen des immer wieder diskutierten Abhängigkeitspotenzials steht die Verschreibung unter dem Betäubungsmittelgesetz. Der Einsatz dieses Medikaments darf erst nach ausreichender Prüfung der Symptomatik und gesicherter Diagnosestellung erfolgen. Seit zwei Jahren ist das Medikament in der retardierten Form auch zur Behandlung von Erwachsenen zugelassen. Allerdings ist beschrieben, dass die Wirkung sich von derjenigen bei Kindern unterscheiden könnte (Levant et al. 2011).

1.3 Fragestellung

Sowohl die beschriebene Diagnostik als auch eine sich möglicherweise anschließende medikamentöse Einstellung erfordern gute Mitarbeit und Geduld bei Patienten und Angehörigen, binden zeitliche Kapazitäten bei Ärzten und Psychologen und erzeugen – vor allem im Falle von Fehldiagnosen oder Non-Response vielleicht sogar unnötig hohe – Kosten für das Gesundheitssystem. Entscheidender ist allerdings das immer wieder diskutierte Risiko für unerwünschte Spätfolgen durch die medikamentöse Therapie. Eine Optimierung in Diagnostik und Pharmakotherapie ruft dementsprechend großes

Interesse hervor. Es wäre von Vorteil, einen leicht messbaren Biomarker für ADHS zu finden, der zum einen eine schnelle und spezifische Diagnosestellung und zum anderen eine gezielte Pharmakotherapie ermöglicht.

Biomarker sind laut dem National Institute of Mental Health (NIMH) Indikatoren für biologische Prozesse, pathologische Prozesse und die Reaktion auf eine therapeutische Intervention. Als Beispiele werden genetische Allele, Proteine beispielsweise im Blut oder Liquor, Bildgebung und elektrophysiologische Messungen aufgeführt. Sie sollen objektiv messbar sein und diagnostische, prognostische oder prädiktive Informationen zu einem Krankheitsbild liefern.

Bisher kann das Erkrankungsrisiko von ADHS nicht durch einzelne Gene erklärt werden. Möglicherweise können verschiedene Genveränderungen ein phänotypisch ähnliches Bild hervorrufen. Liegt eine Genvariante beispielsweise nur bei einem kleinen Anteil an ADHS-Patienten vor, erreicht sie vor allem in kleinen Studien nicht zwangsläufig ein Signifikanzniveau. Außerdem können Steuerungselemente auf der DNA beeinflussen, ob ein Gen abgelesen wird. Ein vorhandenes Risikogen müsste also nicht unbedingt darüber Auskunft geben, ob sich eine Erkrankung im Individuum überhaupt manifestiert. Es ist daher durchaus sinnvoll, die Genexpression als Biomarker zu verwenden. Welche Genkonstellationen und Umwelteinflüsse genau zu dieser Genexpression führen, tritt dabei erst einmal in den Hintergrund. Die Genexpression beginnt mit der Synthese von RNA, welche sich in einem Zellkulturmodell gut untersuchen lässt. Bei der Genese und Behandlung von ADHS lassen sich vor allem Veränderungen im zentralen Nervensystem vermuten. Genau genommen müsste man also Nervenzellen von ADHS-Patienten entnehmen und untersuchen. Das ist aus ethischen und technischen Gründen nicht einfach durchführbar. Außerdem sollen Biomarker leicht messbar und gut reproduzierbar sein. Eine aufwendige oder für den Patienten gefährdende Untersuchung bietet sich nicht zur Diagnostik oder Responseprädiktion und schon gar nicht zur Früherkennung an. Einige Gene finden sich aber sowohl in zentralen als auch in peripheren Zellen wieder. Man hofft also, dass man durch die Untersuchung peripherer

Marker (beispielsweise im Blut) auf komplexere oder weniger zugängige Systeme rückschließen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein peripheres Zellmodell mit Lymphoblasten von ADHS-Patienten gewählt, deren RNA zur Genexpressionsanalyse genutzt wurde. Folgende Fragestellungen wurden untersucht.

- 1) Unterscheidet sich die Genexpression peripherer Zellen von heterogenen ADHS-Probanden gegenüber gesunden Kontrollprobanden?
- 2) Verändert die Behandlung mit Methylphenidat akut die Genexpression peripherer Zellen aus dem Blut?
- 3) Gibt es langfristige Genexpressionsveränderungen durch die Behandlung mit Methylphenidat?
- 4) Beeinflusst Methylphenidat die Genexpression peripherer Zellen von ADHS-Patienten in anderer Weise als bei Kontrollprobanden?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Für die Isolation von Lymphozyten wurden Plasmaproben von zehn Patienten mit adultem ADHS und zehn gesunden Kontrollen entnommen. Die Patientenrekrutierung erfolgte an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität Würzburg. Die psychiatrischen Diagnosen wurden mit Hilfe eines teil-strukturierten klinischen Interviews für die erste Achse der DSM-IV-TR-Störungen von zwei unabhängigen Psychiatern gestellt. Die ausgewählten Patienten erfüllten die Diagnosekriterien des DSM-IV für ADHS im Kindes- bzw. Erwachsenenalter nach den Vorgaben von Conners' Adult ADHD Rating Scale (CAARS) und Wender Utah Rating Scale (WURS) (Conners et al. 1999; Retz-Junginger et al. 2002). Die Gruppe bestand zu gleichen Teilen aus Männern und Frauen. Das Alter lag durchschnittlich bei 28.8 ± 8.7 Jahren und umfasste eine Spannweite von

19-45 Jahren. Die unten stehende Tabelle beschreibt komorbide Erkrankungen und medikamentöse Behandlung der Versuchsprobanden.

Die Kontrollgruppe wurde ebenfalls in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie Würzburg rekrutiert und bestand hauptsächlich aus Mitarbeitern der Klinik. Die Kontrollgruppe wurde mit Hilfe des Diagnostischen Kurzinterviews bei psychischen Störungen (MiniDips) auf psychische Erkrankungen getestet (Margraf 1994). Die Kontrollgruppe besteht aus elf freiwilligen Probanden, die bezüglich ihres ethnischen Hintergrundes und Alters auf die Patientengruppe abgestimmt wurde: drei Männer und neun Frauen mit einem Altersdurchschnitt von $36.2 \pm 14,0$ und einer Spannbreite von 19-57 Jahren. In der Kontrollgruppe wurden sieben Probanden mit folgenden Medikamenten behandelt: Kontrazeptiva (n=3), L-Thyroxin (n=2), Ceterizin (n=1) and antidiabetische und antihypertensive Medikamente (n=1, Metformin, Carvedilol, Ilrbesartan+Hydrochlorothiazid, Liraglutide).

Ausschlusskriterien für Patienten- und Kontrollprobanden waren schwere internistische Erkrankungen, neurologische Erkrankungen, mentale Retardierung, Karzinomleiden und akute oder chronische Infektionskrankheiten. Bei der Kontrollgruppe führten auch psychiatrische Erkrankungen in der Eigenanamnese oder Manifestation bei erstgradigen Verwandten zum Studienausschluss.

Das Vorliegen eines informierten schriftlichen Einverständnisses, das die Helsinki-Deklaration erfüllt, war Voraussetzung für die Teilnahme an der vorliegenden Studie. Die Studie wurde durch das Ethikkommittee der Universität Würzburg geprüft und genehmigt. In der nachfolgenden Tabelle sind Informationen zum Probandenkollektiv zusammengefasst. Weitere Informationen befinden sich im Anhang (Tabelle 12).

Tabelle 1: Zelllinien

Code	Proband	Geb.		Proben-entnahme	Psycho-pharmaka	Medikamen-ten-Response	Psychiatri-sche Komor-bidität	Drogen
SK35	ADHS	1967	f	17.12.2009	Mirtazapin		Depression	
SK36	ADHS	1964	m	17.12.2009	Quetiapin, Venlafaxin, Maprotilin			
SK42	ADHS	1988	m	10.02.2010	Venlafaxin,	MPH	Depression	
SK47	ADHS	1984	f	23.02.2010		Ampheta-min, MPH-Non-Responder	Depression	Cannabis, Ampheta-min
SK90	ADHS	1984	f	29.07.2010		MPH	Z.n. Polytoxi-komanie und Psychose	Polytoxiko-manie, Al-koholab-hängigkeit
SK122	ADHS	1978	m	11.04.2011	Fluoxetin	MPH	Depression	Cannabis, Speed
SK123	ADHS	1989	m	11.04.2011	Valproat			
SK132	ADHS	1987	f	13.05.2011	Venlafaxin		Depression	
SK037	ADS	1990	m	17.12.2009	Venlafaxin			
AR714	ADS					MPH-Non-Responder		
SK15	Kontrolle	1982	f	05.05.2009				
SK20	Kontrolle	1981	m	18.06.2009				
SK30	Kontrolle	1986	f	22.09.2009				
SK50	Kontrolle	1954	f	22.02.2010 02.03.10				
SK52	Kontrolle	1954	m	02.03.2010				
SK53	Kontrolle	1991	f	02.03.2010				
SK55	Kontrolle	1975	f	02.03.2010				
SK58	Kontrolle	1980	f	04.03.2010 09.09.2010				
SK112	Kontrolle	1972	m	24.02.11				
SK141	Kontrolle	1983	f	13.07.2011				
SK142	Kontrolle	1954	f	13.07.2011				

2.1.2 Synthetische Oligonukleotide

Tabelle 2: Synthetische Oligonukleotide

	Genname	Sequenz	Länge [bp]	Locus	Hersteller
Zielgen	<i>ATXN1</i>	NM_000332	10636	6p23	Qiagen
	<i>GLUT3/ SGLC2A3</i>	Forward 5`- GGGTATGATCGG CTCCTTTT-3` Reward 5` GCATTTCAACCGA CTTAGCTACT 3`	140 kb	12p13.3	Eigenherstellung
	<i>GUCY1B3</i>	NM_000857	3266	4q31,3-q33	Qiagen
	<i>HEY1</i>	NM_001040708	2331	8q21	Qiagen
	<i>MAP3K8</i>	NM_001244134	2782	10p11,23	Qiagen
	<i>NAV2</i>	NM_001111018	10687	11p15.1	Qiagen
Referenzgen	<i>ALAS1</i>	NM_000688	2458	3p21,1	Qiagen
	<i>B2M</i>	NM_004048	987	15q21-q22.2	Qiagen
	<i>GUSB</i>	NM_000181	2321	7q21,11	Qiagen
	<i>HPRT1</i>	NM_000194	1435	Xq26.1	Qiagen
	<i>SDHA2</i>	NM_004168	2405		Qiagen
	<i>TBP1</i>	NM_001172085	1719	6q27	Qiagen
	<i>TFRC1</i>	NM_001128148	5100	3q29	Qiagen
	<i>YWHAZ</i>	NM_001135699	3020	8q23.1	Qiagen

2.1.3 Reaktionskits

Tabelle 3: Reaktionskits

Experion™ RNA StdSens Analysis Kit	BioRad Laboratories, Hercules, USA
iScript™ cDNA Synthesis Kit	BioRad Laboratories, Hercules, USA
RNeasy® Plus Mini Kit (250)	Qiagen, Hilden, Deutschland
IQ™ SYBR® Green Supermix	BioRad Laboratories, Hercules, USA

2.1.4 Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien

1% Gentamycin	Gibco 15750-037, Darmstadt
0,05% Trypsin-Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	Gibco, Karlsruhe
1% L-Glutamin	L-Glutamin 200mM (100x), Gibco 25030-032, Darmstadt
17,5% FBS	Feales Bovine Serum, Gibco 16140-063, Darmstadt
Agarose peqGold	peqLab, Erlangen
Blaupuffer	25 mg Bromphenolblau- Xylencyanol, 1,5ml Glycerol, auf 10ml mit H2O aufgefüllt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMSO	Dimethylsulfoxid, #36720050, AppliChem Darmstadt
Epstein-Barr-Virus	Zelllinie B-95-8
Ethanol	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Ethanol 70%	
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ficoll	Ficoll-Paque Research Grade, Amersham Biosciences#17144002
Fötales Rinderserum Hi (FBS)	Gibco, Karlsruhe
GeneRuler DNA-Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot
Gentamicin (50 mg/ml)	Gibco, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin (200mM)	Gibco, Karlsruhe
Lithiumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Merck-Wasser	Merck, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂ für MgCl ₂ -Puffer (Eigenherstellung)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Mycoplasma-Off® Desinfektionsspray	Minerva Biolabs GmbH, Berlin
PBS	Phosphate Buffered Saline, Gibco *#14190-094, Karlsruhe
PCR-Puffer	500 µl 1 M KCl, 100µl 1M Tris-HCl pH 8.3, 25µl 10% Tween 20

Propidiumiodid	Invitrogen, USA
Puffer RLT+	Qiagen, Hilden, Deutschland
Puffer RPE Plus	Qiagen, Hilden, Deutschland
Puffer RW1	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNA protect Cell Reagent	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNA protect® Cell Reagent	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase freies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland
RPMI 1640-Medium	Gibco *#31870-017, Roswell Park Memorial Institute
TAE-Laufpuffer	121 g/l Tris Base, 28,5 ml Eisessig, 50 ml EDTA 0,5 M/pH 8 auf 1 mit H2O aufgefüllt
TE-Puffer, 1x, pH 8,0	AppliChem GmbH, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt

2.1.5 Spezielle Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Spezielle Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien

5 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nürnberg
8-Kanal-Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Aluminiumfolie für qRT PCR-Platten	Biozym Scientific GmbH
Cellometer-Zählkammer SD100	Nexcelom Bioscience
Einfrierbox mit Isopropanol	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Eppendorf Combitips	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml/2 ml	Eppendorf, Hamburg
Erlenmeyer Kolben 100-1000 ml	Schott-Duran, Wertheim
Falcon Röhrchen 15 ml/50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Folie für qRT PCR-Platten „B“ Film	BioRad Laboratories, München
GeneChip human Genom U133 Plus 2.0 Microarray	Affymetrix, Santa Clara, CA
Kulturflaschen für Suspensionszellen	Sarstedt, Nürnberg
Multipipetten	Eppendorf, Hamburg
Multiply®-µStripProBiosphere Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürnberg
Neubauer-Zählkammer C-Chip	DigitalBio, Seoul/Korea
Pipetboy Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen epT.I.P.S® Motion Reloads 1-50 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen für qRT PCR	Sarstedt, Nürnberg

Pipettenspitzen für Sonstiges	Sarstedt, Nürnberg
Platten für qRT PCR 384-Well cLR/WHT	BioRad Laboratories, München
Safe-Lock Reaktionsgefäße 1,5 ml/2 ml	Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Twin.tec PCR Platten 96 semi-skirted	Eppendorf, Hamburg

2.1.6 Geräte

Zur Grundausstattung eines Labors gehörende Geräte sind nicht extra aufgelistet.

Tabelle 6: Geräte

Beschreibung	Hersteller	Typ
Thermocycler	Biometra, Göttingen	Biometra Thermocycler
	BioRad Laboratories, München	CFX384 <i>real-time</i> System C1000™ Thermal Cycler
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg	Thermomixer comfort
Vortex-Mixer	Eppendorf, Hamburg	Microspin FV-2400
Automatisiertes Pipettiersystem	Eppendorf, Hamburg	epMotion 5075
Photometer	peqLab, Erlangen	NanoDrop ND-1000
UV-Photokammer	BioRad Laboratories	ChemiDoc UV Shield
Mikrowelle	Sharp, Hamburg	Express R-239
Gelkammer	peqLab, Erlangen	B2
Heizschüttler	EB Johanna Otto, Hechingen	TH15
Zentrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen	Rotofix 32A
	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen	Mikro 220R
	Eppendorf, Hamburg	Centrifuge 5430
Automatisiertes Nukleinsäureanalysegerät	BioRad Laboratories	Experion Automated Electrophoresis Station
	BioRad Laboratories	Experion Vortex Station II
	BioRad Laboratories	Experion Priming Station
Feinwaage	Mettler-Toledo	PM300
	Mettler-Toledo	AT21 Comparator
UV-Lampe	Konrad Benda	N-12 k
	A.Hartenstein, Würzburg	VL 4LC
Spannungsgerät	Consort, Turnhout/ Belgien	E431

	Consort, Turnhout/ Belgien	E835
	Biometra, Göttingen	Elphor.-Powerpack P24
Abzugsschrank	Köttermann	
Reinstwasseraufbereitungssystem	Barnsteadn New Hampshire	NANOpureDiamond
Wasserbad	Grant Instruments, Cambridgeshire/UK	JB Aqua 12
CO ² -Inkubator	BeLoTec	Labotect C200
	Thermo Scientific	HERAcell 150
Autoklav	Systec	VX-40
Absaugsystem	Integra Biosciences	VACUSAFE
Sicherheitswerkbank	NuAire, Eurasburg	ClassII Biological Safety Cabinets
Elektronenmikroskop	Leica	DMIL
	Zeiss	ID02
Automatisiertes Zellzählssystem	Nexcelom Bioscience	Cellometer AutoT4

2.1.7 Software

Tabelle 7: Software

Bioconductor Version 2.11	http://www.bioconductor.org
Cellometer	Nexcelcom, Lawrence, MA 01843
ChemBioDrawUltra 12.0.2.1076	CambridgeSoft, 2012, Cambridge, MA
ChemiDoc	Bio-Rad, Hercules, CA 94547 US
Experion	Experion™ Software #700-7050, Version 3.20, PC, operation and standard data analysis software, for use with the Experion automated electrophoresis system
GeoGebra	http://www.geogebra.org/ , Markus Hohenwarter (Austria & USA 2001)
IBM SPSS	Version V19 IBM® SPSS® Statistics V19, 2010, Armonk, USA
LinReg PCR 2011	Version 12.17, November 2011, based on Ruijter et al. Nucleic Acids Research, Heart Failure Research Center, Amsterdam, Netherlands
Micro Array Datenanalyse R version 2.15.1	http://www.r-project.org

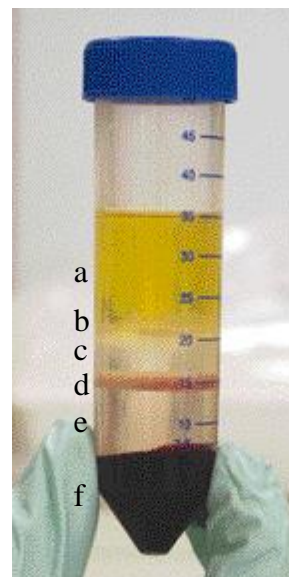
Microsoft Office 2003	Microsoft, L – 2543 Luxembourg
Microsoft Office 2007	Microsoft, L – 2543 Luxembourg
NanoDrop 1000	Thermo Scientific, Wilmington, DE 19810 USA
Open Office	http://www.openoffice.org/de/
Realtime	Bio-Rad CFX Manager TM -Software (Version 3.0)
Statistica	IBM® SPSS® Statistics V19, 2010, Armonk, USA
Zotero	http://www.zotero.org/ , März 2013

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung humaner Lymphozyten

Jedem Probanden wurden 9 ml peripheres venöses Blut entnommen und bis zur Verarbeitung im EDTA-Entnahmeröhrchen bei Raumtemperatur gelagert. EDTA ist ein starker Komplexbildner und verhindert die Koagulation des Blutes, da die für die Blutgerinnung notwendigen Ca^{2+} -Ionen abgefangen werden. Nachdem auch die übrigen Reagenzien bei Raumtemperatur äquilibriert worden sind, konnte die Separation der Blutzellen in Leucosep[®]-Röhrchen entsprechend Herstellerprotokoll erfolgen (Greiner Bio One 2007). Dazu wurden 3 ml Ficoll-Paque PLUS[®] auf die poröse Polyethyltrenscheibe des Röhrchens vorgelegt und anschließend eine Minute bei 1000 rpm zentrifugiert, damit sich die Lösung unter der Trennscheibe absetzte. Überschüssige Lösung auf der Scheibe wurde ggf. abpipettiert. Die Nutzung der Trennscheibe erübrigte das aufwendige Überschichten des Probenmaterials. Außerdem wurde eine Durchmischung von separierten Blutzellen nach der Zentrifugation erschwert. Ficoll-Paque PLUS[®] stellt ein steriles Separationsmedium mit einer Dichte von 1,077 g/ml dar, das aus 5,7 % w/v Ficoll PM 400 und 9 % w/v Natriumdiatrizoat besteht (Amersahn Biosciences 2001). Ficoll enthält mehrfach verzweigte Sacharosepolymere mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 400 kDa. Aufgrund vieler Hydroxylgruppen zeigt es eine gute Löslichkeit in wässrigem Medium. Es ist in alkalischen und neutralen Lösungen stabil, hydrolysiert aber ab pH 3 vor allem bei höheren Temperaturen. Da die Moleküle keine geladenen Gruppen tragen, reagieren sie unter physiologischen Bedingungen nicht. Im

Gegensatz zu Saccharose kann Ficoll in Konzentrationen bis zu 50 % verwendet werden, ohne die physiologische Osmolarität zu überschreiten. So kann man einen isotonischen Dichtegradienten erzeugen, der die Separation der Blutzellen bei Erhalt der funktionellen und morphologischen Merkmale ermöglicht. Unter Verwendung von Saccharose müsste man eine sehr viel höhere Osmolarität in Kauf nehmen, um gleiche Dichtegradienten zu erzeugen (Amersahn Biosciences 2001). Dabei stiege der osmotische Druck auf die Zellen so sehr an, dass ein hohes Risiko von Membranschäden in Folge osmotischer Zellschwellung bestünde. Um eine bessere Auftrennung zu erreichen, wurde das Blut mit PBS im Verhältnis 1:2 verdünnt und anschließend langsam auf die Trennscheibe pipettiert. Im Anschluss erfolgte eine zehnmünütige Zentrifugation bei 2500 rpm und ausgeschalteter Bremse. Bei der Zentrifugation wurden die Blutzellen anhand ihrer Dichte getrennt. Zellpartikel mit höherer Dichte als Ficoll wurden in den unteren Schichten des Trennmediums angereichert. So wurden die Lymphozyten und mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von den unerwünschten Erythrozyten und Granulozyten getrennt. Nach der Zentrifugation beobachtete man eine Vierschichtung (s. Abbildung 1)



- a) Plasma
- b) Lymphozytenzellfraktion und PBMC's
- c) Separationsmedium
- d) Trennscheibe
- e) Separationsmedium
- f) Pellet (Erythrozyten und Granulozyten)

Abbildung 1: Leucosepröhrchen nach der Befüllung und nach der Zentrifugation (Greiner Bio One 2007)

Die angereicherten Lymphozyten konnten nun mit Hilfe einer serologischen Pipette abgesaugt und dann in ein mit 8ml PBS gefülltes 15ml Röhrchen mit Spitzboden überführt werden. PBS stellt eine isotonische Salzlösung dar, die eine Pufferkapazität bei physiologischen pH besitzt und humanen Zellen keinen Schaden zufügt. Dann zentrifugierte man die Lymphozyten 10 Minuten bei 800 rpm. Dieser Waschschrift wurde insgesamt dreimal wiederholt, indem der Überstand nach der Zentrifugation abpipettiert und das gebildete Pellet in neuer PBS-Lösung resuspendiert wurde. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Zellpellet in 1ml Kulturmedium gelöst.

2.2.2 Transformation mit Epstein-Barr-Virus

Bei der Kultivierung einer Zellpopulation außerhalb eines biologischen Organismus, ist die Lebensdauer der Zellen immer begrenzt. Nach einer gewissen Zeit nimmt die Zellteilungsrate ab und es kommt zur Seneszenz, einer Art permanenter Zellzykluspause ohne Zellgrößenwachstum. Obwohl diese auch als Primärzellen bezeichneten Kulturen nur wenige Veränderungen gegenüber ihren physiologischen Vertretern vorweisen, eignen sie sich nicht für zeitlich ausgedehnte Versuchsreihen (Schmitz 2011) Um derartige Studien zu ermöglichen, muss man die Zellen transformieren. So veränderte unsterbliche Zellen bezeichnet man als Dauerkulturen bzw. permanente Kulturen.

Das hier verwendete Verfahren nutzt die Eigenschaften des Epstein-Barr-Virus aus. Nach Isolierung der humanen Lymphozyten wurden 0,5 ml Virusüberstand der Zelllinie B 95-8 zur Lymphozytenkultur gegeben. Die Kulturen ruhten anschließend für etwa 12 Stunden im Inkubator bei 37 °C, bevor man sie erneut 10 Minuten bei 800 rpm zentrifugierte, den Überstand vollständig mit der serologischen Pipette abnahm und durch 1,5 ml frisches RPMI-Medium ersetzte.

Das γ -Herpesvirus EBV besitzt ein doppelsträngiges DNA-Genom von 172 kb, das für ca. 100 Proteine kodiert. Für die Transformation des humanen B-Lymphozyten, dem natürlichen Wirt des Virus, sind davon allerdings nur wenige von Bedeutung. Die Expressionsvielfalt dieser Gene ist vom jeweiligen Latenzstadium abhängig, die EBV nach Infektion der B-Zelle zeigt. Das für die Laborzelle relevante Stadium entspricht Latenzstadi-

um III. Es kann nur unter Abwesenheit von EBV-spezifischen T-Zellen erreicht werden, da diese die infizierte B-Zelle sonst eliminieren würden. Unter physiologischen Bedingungen manifestiert es sich daher meist nur in großzelligen B-Zell-Lymphomen bei Immunsupprimierten. Um sein langfristiges Überleben zu sichern, greift EBV mit seinen translatierten Genen EBNA-LP und EBNA-2 in den Zellzyklus, mit LMP-1 und LMP-2a in intrazelluläre Signalwege, BALF-1 und BHFR-1 in den intrinsischen Weg der Apoptose und mit BCRF-1 in autokrine und parakrine Mechanismen ein (Hahn 2009).

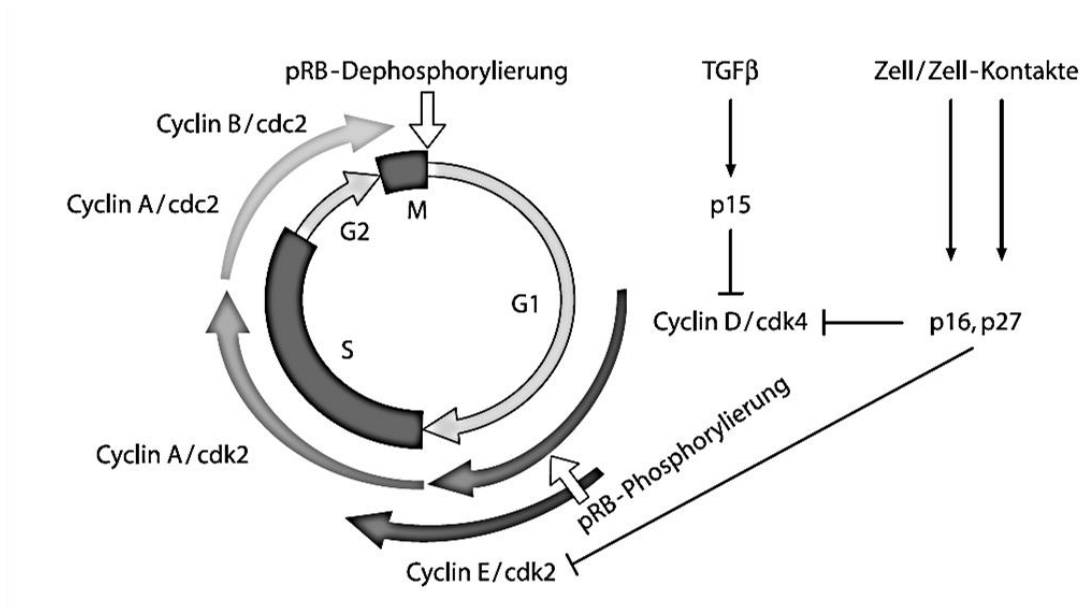


Abbildung 2: Zellzyklusregulation durch RB (Hahn 2009)

Die Epstein-Barr nuklearen Antigene EBNA-LP und EBNA-2 stellen Analoga zu Cyclin D dar. Sie erreichen die durch Phosphorylierung ausgelöste Inaktivierung des hypophosphorylierten Retinoblastom-Gens (Rb) allerdings im Komplex mit cdk6 (nicht wie bei Cyclin D mit cdk4). In aktiver Form verhindert Rb zum einen indirekt durch physikalische Blockade der E2F-Transaktivierungsdomäne zum anderen direkt durch Rekrutierung von Histondeacetylasen den Eintritt in die Synthesephase des Zellzyklus. Da so auch die Synthese viraler DNA und Proliferation des Virus nicht möglich wäre, heben EBNAs die pRb-Funktion wieder auf. Hyperphosphoryliertes Rb gibt den zuvor gebun-

denen Transkriptionsfaktor E2F wieder frei. Die so geöffnete Bindungsstelle stellt eine Transaktivierungsdomäne dar, die E2F benötigt, um die Transkription bestimmter Gene zu stimulieren. Unter anderem betrifft dies Proteine, die den Übergang der G1-Phase in die Synthesephase des Zellzyklus bewirken. Dazu zählen Histondeacetylasen (HDAC), deren Histonmodifikation die DNA-Struktur lockert und so die Transkription erleichtert. Andere Proteine wie die Dihydrofolat-Synthetasen oder die Thymidinkinasen sind in die Synthese von DNA-Vorläufer-Nukleotiden involviert. Außerdem werden direkt in die DNA-Replikation einbezogene Gene transkribiert. Gleichzeitig hebt die pRB-Phosphorylierung die direkte Transkriptionseinhibierung auf (Weinberg 2006). In hypo-phosphoryliertem Zustand rekrutiert pRB HDACs, die benachbarte Histonmoleküle deacetylieren und dadurch eine starke Spiralisierung der anliegenden DNA bewirken. Dies verhindert die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren und damit die Expression der auf dem entsprechenden DNA-Abschnitt kodierten Gene.

Die latenten Membranproteine LMP-1 und LMP-2a induzieren Wachstumssignale, die einen Antigenkontakt mit der B-Zelle imitieren und die Entwicklung zur immortalen Gedächtniszelle ermöglichen. Dabei übernimmt LMP-2a die B-Zell-Rezeptor Signale nach Antigenkontakt, LMP-1 rekrutiert TRAF und TRADD und induziert die NFκB- und JNK-Signalwege, die eigentlich durch CD-40 der T-Zelle ausgelöst werden und zur Proliferation der B-Zelle und Verhinderung der Apoptose führen (Neugebauer 2007).

BALF-1 und BHFR-1 ähneln dem Apoptose-Inhibitor bcl-2 und brechen den intrinsischen Weg zur Initiation der Apoptose ab.

Das BCRF-1-Gen kodiert für ein Homolog des Interleukin-10, welches die Aktivität der NK-Zellen und der zytotoxischen T-Zellen hemmt, die eine mit EBV-infizierte B-Zelle nach Detektion eliminieren würden.

Die Transformation von Zellen, die u.a. mit EBV vollzogen wird, kann zu numerischen oder strukturellen Veränderungen der Chromosomen oder morphologischen Veränderungen der Zellen führen. Obwohl so evtl. veränderte Zelleigenschaften zwischen in vitro und physiologischen Zellen Genexpressionsuntersuchungen beeinflussen könnten, lässt sich dieser Schritt für längere Versuchsreihen nicht vermeiden.

2.2.3 Herstellung des Kulturmediums

Zur Kultivierung der Zellen wurde ein mit 17,5 ml FBS und 1,1 ml Glutamin versetztes RPMI-Medium verwendet. Es handelte sich hierbei um ein Kulturmedium für Suspensionszellen, das neben Nährstoffen und Wachstumsfaktoren ein Hydrogencarbonatpuffersystem enthielt. Dieses puffert unter CO₂-Begasung im Inkubator die Stoffwechselprodukte der Zellen ab, die das Medium bei längerer Kultivierung ansäuern würden. Zur Überprüfung des pH-Wertes wurde der Indikator Phenolrot hinzugefügt, der sich bei pH 7,4 rot, höheren pH-Werten violett und saurem pH orange färbt. Ein basischer pH weist auf eine schlechte Begasung, ein saurer pH auf eine veraltete Kultur oder eine zu hohe CO₂-Konzentration hin (Schmitz 2011). Außerdem enthielt das Medium Aminosäuren, Spurenelemente, Vitamine, Mineralsalze und Glukose als Kohlenhydratquelle für die Glykolyse der Zellen (Boxberger 2007). Das zum Medium addierte fetale Rinderkalbsserum diente einem verbesserten Zellwachstum und dem Erhalt der Differenzierung. Seine Bestandteile sind Proteine, Wachstumsfaktoren, Spurenelemente, Salze, die auch als Puffersysteme fungieren, anorganische Ionen für das Elektrolytgleichgewicht, Anheftungsfaktoren wie Fibronectin und Fetuin, Transferrin als Eisenlieferanten und Hormone wie Insulin und Hydrocortison (Boxberger 2007). Da die Aminosäure Glutamin einen wachstumsbegrenzenden Faktor darstellt, wurde sie ebenfalls hinzugefügt.

2.2.4 Kultivierung

In den ersten zwei Wochen nach Transformation wurden die Zellkulturen in den 15 ml Röhrchen mit leicht angedrehtem Deckel im Inkubator bei 37 °C unter CO₂-Begasung kultiviert. Da die im Medium enthaltenen Nährstoffe und Wachstumsfaktoren essentiell für ein optimales Wachstum der Kultur sind, musste man aufgebrauchte Mediumbestandteile regelmäßig austauschen. Dazu wurden mit einer serologischen Pipette etwa die obere Hälfte des vorhandenen Mediums entnommen und durch neues RPMI-Medium ersetzt. Um die Zellen zu schonen, wurde das Medium im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt und langsam ohne Aufwirbelungen pipettiert. Zur homogenen Verteilung des neuen Mediums wurde der Anzuchtbehälter leicht geschwenkt. In welcher

Frequenz ein Mediumwechsel durchgeführt werden musste, hing vom Stoffwechsel der jeweiligen Population ab, die man am Farbumschlag des im Medium vorhandenen pH-Indikators ablesen konnte. Sie lag bei etwa zwei Tagen. Bei einer ausreichend großen Zelldichte von etwa 0,5 Mio. Zellen/ml wurden die Kulturen in Zellkulturflaschen der Firma *SARSTEDT* mit einem Wachstumsbereich von 25 ml und Gesamtvolumen von 50 ml umgesetzt. Dazu wurden zunächst etwa 2 ml RPMI-Medium in die Zellkulturflasche vorgelegt. Etwa die Hälfte des vorhandenen Mediums im Röhrchen wurde abgesaugt und verworfen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Pasteurpipette in das vorgelegte Medium der neuen Zellkulturflasche überführt. Um sicherzugehen, dass keine Zellen im Röhrchen verblieben waren, wurde es mit ca. 1 ml RPMI-Medium gespült, welches man anschließend ebenfalls in die Zellkulturflasche überführte. Die Zellkulturflaschen besitzen eine hydrophobe Wachstumsfläche, die Wechselwirkungen mit der Zellkultur verhindern soll. Durch Reduktion von Mikroadhäsionen werden Zellverluste minimiert. Die Schnellverschluss-Schraubkappe verfügt mit ihrem Plug seal cap über einen Belüftungsfunktion, die durch ihre 0,2 µm dicke hydrophobe Filtermembran einen ständigen Gasaustausch ermöglicht, ohne dass Keime in die Kulturflasche gelangen können.

2.2.5 Splitten

Das Anlegen einer Subkultur aus einer bereits bestehenden Kultur bezeichnet man als Splitten. Dieses Verfahren wendet man an, um z.B. Auswirkungen unterschiedlicher Behandlungen auf dieselbe Zellpopulation beurteilen zu können. Verwendet man zwei Kulturen desselben Probanden, ist es wahrscheinlich, dass Unterschiede in der Genexpression einen Behandlungseffekt zeigen und nicht auf Individuen spezifische Variabilität zurückzuführen sind. Ein weiterer Grund für das Anlegen einer Subkultur ist die Kontakthemmung (Lindl and Gstraunthaler 2008).

Beim Splitten von Suspensionszellen wurde eine neue Kulturflasche angelegt, deren Boden mit vorgewärmtem Medium bedeckt wurde. Anschließend wurde mit der sero-

logischen Pipette ein Teil der Zellen der vorhandenen Kultur in die neue Flasche überführt. Die Ursprungskultur wurde mit frischem Medium versorgt.

2.2.6 Kontamination

Bei einer Trübung des Kulturmediums besteht immer der Verdacht auf eine Kontamination. Diese werden am häufigsten durch Bakterien (vor allem Mykoplasmen) oder Pilze hervorgerufen, die während des Mediumwechsels auf die Kultur übertragen werden. Um Kontaminationen möglichst gering zu halten, wurden folgende Schutzmaßnahmen durchgeführt: Desinfektion der Arbeitsflächen mit Mycoplasma-Off®-Spray, Desinfektion der RPMI-Mediumflasche und der verwendeten Einweg-Pasteurpipetten mit 70 %igem Ethanol, Abflammen des Schraubverschlusses der Mediumflasche in der Bunsenbrennerflamme. Des Weiteren erfolgten alle Arbeiten unter dem Abzug im Zellkulturlabor und mit Schutzkleidung wie Kittel, Einweghandschuhen, Mundschutz, Arm- und Fußstulpen. Eine regelmäßige PCR-Testung des Kulturüberstandes auf Mykoplasmen wurde durchgeführt, damit trotzdem eintretende Kontaminationen schnell zu detektieren.

2.2.7 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung ist eine Methode zur Langzeitlagerung von Zellen. Der griechische Begriff „κρύος“ bedeutet „Kälte“, das lateinische „conservare“ kann man mit „erhalten“ übersetzen. Bei Temperaturen von -196 °C , die durch Verwendung von flüssigem Stickstoff erreicht werden, kommt der zelluläre Stoffwechsel aufgrund von Energiemangel vollständig zum Erliegen. Ein Problem beim Einfrieren von Zellen stellt die Bildung von Eiskristallen dar. Dadurch, dass der Extrazellulärflüssigkeit flüssiges Wasser entzogen wird, erhöht sich die Konzentration osmotisch wirksamer Teilchen um die Zellen. Um das entstandene Konzentrationsgefälle zwischen Extra- und Intrazellularraum auszugleichen, muss entweder Wasser aus dem Zellinneren ausströmen oder im Zellinneren gefrieren. Welcher der beiden Vorgänge überwiegt, hängt von der Abkühlgeschwindigkeit ab. Bei langsamem Abkühlen kommt es eher zum Ausstrom des intra-

zellulären Wassers, die Zelle dehydriert, es bilden sich wenige große Eiskristalle. Bei hoher Kühlrate dehydriert die Zelle nicht so stark, dafür bilden sich viele kleine Eiskristalle im Zellinneren. Verringert sich die Wasserkonzentration im Zellinneren auf unter 30 %, kommt es zu irreversiblen Zellschäden. Eiskristallbildung geht mit einer intrazellulären Volumenerhöhung einher, was für die Zelle mechanischen Stress darstellt und ebenfalls zu Zellschäden führt. Die in den Zellzwischenräumen eingelagerten Kristalle üben auch beim Auftauprozess einen erheblichen, schädigenden Druck auf die Zellen aus.

Damit die Ausgangseigenschaften und damit die Lebensfähigkeit der Zellen bei der Kryokonservierung trotzdem erhalten bleiben, muss zum einen die durch das Protokoll vorgegebene optimale Kühlungsrate eingehalten zum anderen ein spezielles Freezing-Medium verwendet werden. Dieses besteht zu 80 % aus dem oben beschriebenen Kulturmedium, zu 10 % aus Dimethylsulfoxid (DMSO) und 10 % FBS. DMSO ist ein polares, organisches Lösungsmittel, das Veränderungen im Elektrolytgleichgewicht reduziert, die Bildung von Eiskristallen während des Einfrierens verringert und außerdem zur Ausbildung von kleinen Kanälen führt, die den Zellen beim Auftauen einen Schutzraum gewähren. DMSO penetriert wegen des geringen Molekulargewichts die Zellemembran und erhöht aufgrund seiner hygroskopischen Eigenschaften die Elektrolytkonzentration im Zellinneren. Der beim Einfrieren entstehende osmotische Gradient von H₂O nach außen wird dadurch gering gehalten. Indem sich DMSO als polare Substanz zwischen die Wassermoleküle drängt und durch seine hohe Viskosität bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt einen „glasartigen“ Zustand hervorruft, verhindert es die Ausbildung einer regelmäßigen Eisstruktur. Da DMSO in hoher Konzentration zytotoxisch wirkt, ist es notwendig, das Einfriermedium mit Kulturmedium zu verdünnen. Das beigefügte FBS schützt die Zellen aufgrund seines hohen Proteingehalts. Vor der Konservierung wurden die Zellsuspensionen gewaschen. Dazu entnahm man den Überstand aus den Kulturflaschen und ersetzte ihn durch 10 ml frisches Kulturmedium. Anschließend überführte man die Zellen in ein 15 ml Falconröhrchen und zentrifugierte sie 5 min bei 700 rpm. Nachdem wiederum der Überstand abpipettiert wurde, konnte das Zellpellet in 3 ml Freezing Medium resuspendiert werden. Je 1 ml dieser Suspension wurde in ein

Nunc-Kryoröhrchen überführt und in eine bei -80 °C vorgekühlte Einfrierbox mit Isopropanol gesetzt. Damit bei der späteren Lagerung nicht zu viel Stickstoff in die Probe gelangen konnte, der während des Auftauens entweichen und zur Explosion führen könnte, war es wichtig, die Röhrchen genau bis zur Markierungslinie zu füllen. Bevor die Proben allerdings in den Stickstofftank überführt wurden, erfolgte eine Lagerung von ca. 12 h bei -80°C.

Beim Auftauen der Zellen für eine erneute Kultivierung war schnelles Arbeiten von großer Bedeutung, da der zytotoxische Effekt von DMSO dadurch zeitlich begrenzt werden konnte. Die Kryoröhrchen wurden mit 70 % Ethanol desinfiziert, leicht ange dreht und im Inkubator bei 37 °C erwärmt. Bevor sich die Eiskristalle vollständig gelöst hatten, wurde der Inhalt in ein mit 10 ml FBS befülltes 15 ml Falconröhrchen überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 700 rpm konnte der Überstand vollständig entfernt, das Pellet mit 3 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt werden.

2.2.8 Zellzählung und Untersuchung der Zellvitalität

Die Zellzählung gehört zu einer Routinemethode bei der Arbeit mit Zellkulturen. Zum einen kann man durch eine regelmäßige Zellzählung das Wachstumsverhalten seiner Kulturen quantifizieren, um zum Beispiel die Frequenz des Mediumwechsels festzulegen, toxische Einflüsse von Substanzen zu beurteilen oder den richtigen Zeitpunkt zum Splitten oder Einfrieren (bei ca. 1 Mio. Zellen pro μ l) der Kultur zu finden. Die Zellkonzentration im Kulturmedium ist für die Proliferation der Zellen von entscheidener Bedeutung. Berühren sich die Zellmembranen zweier Zellen, kommt es zur Kontakthemmung, die Zellen treten in die G₀-Phase des Zellzyklus ein (Schmitz 2011) Auch wenn dieses Phänomen bei transformierten Zellen von untergeordneter Bedeutung ist, schadet eine zu hohe Zelldichte der Population. Aufgrund des geringeren Nährstoffangebots pro Einzelzelle kommt es zu einem gewissen Selektionsdruck, was die Morphologie und Eigenschaften der Zellen beeinflussen kann. Ist das Nährstoffangebot zu gering, kommt

es zur Apoptose. Zurückbleibende Zellfragmente abgestorbener Zellen verunreinigen das Medium und hemmen das Wachstum der noch lebenden Zellen.

Zum anderen ist die Kenntnis über die exakte Zellzahl für die RNA-Extraktion essentiell. So benötigt man diese zur Berechnung der Volumenkonzentration von *Cell-Protect-Reagenz* und *RLT plus* Puffer, um eine ausreichende Stabilisierung der RNA und Zellyse zu gewährleisten. Auch die Entfernungskapazität der *gDNA eliminator spin columns* und die RNA-Bindungskapazität der *RNeasy spin columns* ist abhängig von der Zellzahl. Zu hohe Zellkonzentrationen können zu gDNA-Verunreinigungen führen, weil die Zellen ab einer gewissen Menge den gDNA-Filter verstopfen. Außerdem können Verlust der RNA-Ausbeute bzw. Integrität auftreten.

Um bei der Zellzählung zwischen lebenden und toten Zellen differenzieren zu können, nutzt man die Färbereigenschaften von Trypanblau (auch Benzaminblau) aus. Dieser saure Farbstoff kann aufgrund seiner Molekülgröße von 960,8 g/mol die intakte Zellmembran lebender Zellen nicht passieren (Joppien, Maier, and Wendling 2010). Bei Membranschädigung, die sich bei absterbenden Zellen einstellt, dringt die dunkelblaue Substanz in das Zytoplasma der Zelle ein. Lichtmikroskopisch erscheinen lebende Zellen deswegen leuchtend hell, tote hingegen tiefblau. Da Trypanblau allerdings zytotoxisch ist, erfordert eine aussagekräftige Zellzählung schnelles Arbeiten. Auch eine zu hohe Proteinkonzentration kann die Zählung beeinflussen.

Zur Zellzahlbestimmung wurden mit der serologischen Pipette ca. 100 µl in ein steril verpacktes 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Nach ordentlicher Suspension wurden 10 µl der entnommenen Zellen mit 90 µl Trypanblau gemischt. Der anschließende Zählvorgang wurde mit einem automatisierten Zellometer und stichprobenartig manuell durchgeführt.

2.2.8.1 Hämozytometer

Zur manuellen Zellzahlbestimmung pipettierte man 10 µl der mit Trypanblau gemischten Zellen in eine Einmalzählkammer von *Hartenstein*. Diese enthält ein *Neubauer-*

Zählraster mit vier großen Eckquadraten bestehend aus jeweils 16 kleineren Quadraten. Unter dem Lichtmikroskop zählt man bei 10-facher Vergrößerung die vier großen Eckquadrate aus und bildet den Durchschnitt. Bei einer homogenen Zellverteilung ist die Auszählung von weniger Eckquadraten möglich. Die Verwendung eines manuellen Zellzählers erleichtert das Auszählen. Um Doppelzählungen von Zellen auf Quadraträndern zu vermeiden, bietet es sich an, jeweils zwei Ränder jedes Quadrats von der Zählung auszuschließen. Zur Berechnung der Zellkonzentration musste man zu einem den Verdünnungsfaktor 10 durch die Mischung mit Trypanblau zum anderen den Kammerfaktor berücksichtigen. Den Kammerfaktor verwendet man, um die ermittelte Zellzahl eines Großquadrats auf einen Milliliter zu beziehen. Er errechnet sich aus dem Volumen eines Großquadrats, welches sich aus seiner Fläche (hier 1 mm^2) multipliziert mit der Kammertiefe (hier $0,1 \text{ mm}$) ergibt (Boxberger 2007). Da ein Großquadrat demzufolge ein Volumen von $0,1 \mu\text{l}$ hat, ergibt sich ein Kammerfaktor von 10^4 . Die durchschnittlich ermittelte Zellzahl eines Großquadrats multiplizierte man also insgesamt mit 10^5 . Durch eine gesonderte Zählung der nur blau gefärbten Zellen, erhielt man einen Überblick über die Zellvitalität der Kultur.

2.2.8.2 Cellometer

Da eine manuelle Zählung zwar genau, aber sehr zeitaufwendig ist, wurde sie in der vorliegenden Arbeit nur stichprobenartig durchgeführt, um die Zählung mit dem *Cellometer* zu überprüfen.

Für die automatisierte Zählung wurde die entnommene Zellsuspension, wie oben beschrieben, verdünnt. Da die *Cellometerchips* für dieses Gerät allerdings ein größeres Volumen umfassten, musste man $20 \mu\text{l}$ der gut gemischten Suspension in die Zählkammern pipettieren. Nach Einsetzen des Chips und unter Berücksichtigung der Verdünnung erfolgte die automatisierte Zählung, bei der man in gefärbte und ungefärbte Zellen differenzieren sowie eine Bestimmung des Zelldurchmessers vornehmen konnte. Da es bei nicht ausreichend voneinander getrennten Zellen oder ganzen Zellklumpen zu

Fehlzählungen kommen kann, war es notwendig, sich die gezählten Zellen anzeigen zu lassen und die Zählung ggf. per Hand nachzjustieren.

2.2.9 Methylphenidat im Versuchsmodell

Da Methylphenidat in pulverisierter Form vorlag, wurde es zunächst in RPMI-Medium ohne weitere Zusätze gelöst. Es wurde ein Stock mit einer Methylphenidatkonzentration von 10 µg/ml angelegt, der anschließend in sterile 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße aliquotiert wurde. Da MPH nicht in Reinform (molare Masse 233.31 g/mol) sondern als Methylphenidathydrochlorid (269.76 g/mol) vorlag, mussten 1,156 mg ($269.76/233.31$) Methylphenidathydrochlorid in RPMI-Medium gelöst werden. Nachdem das Pulver mit Hilfe einer Feinwaage abgewogen wurde, erfolgte eine Lösung in ca. 2 ml Medium, welches dann mit einer serologischen Pipette in die 100 ml Mediumflasche überführt wurde. Zur homogenen Verteilung wurde das Gefäß mehrfach geschwenkt.

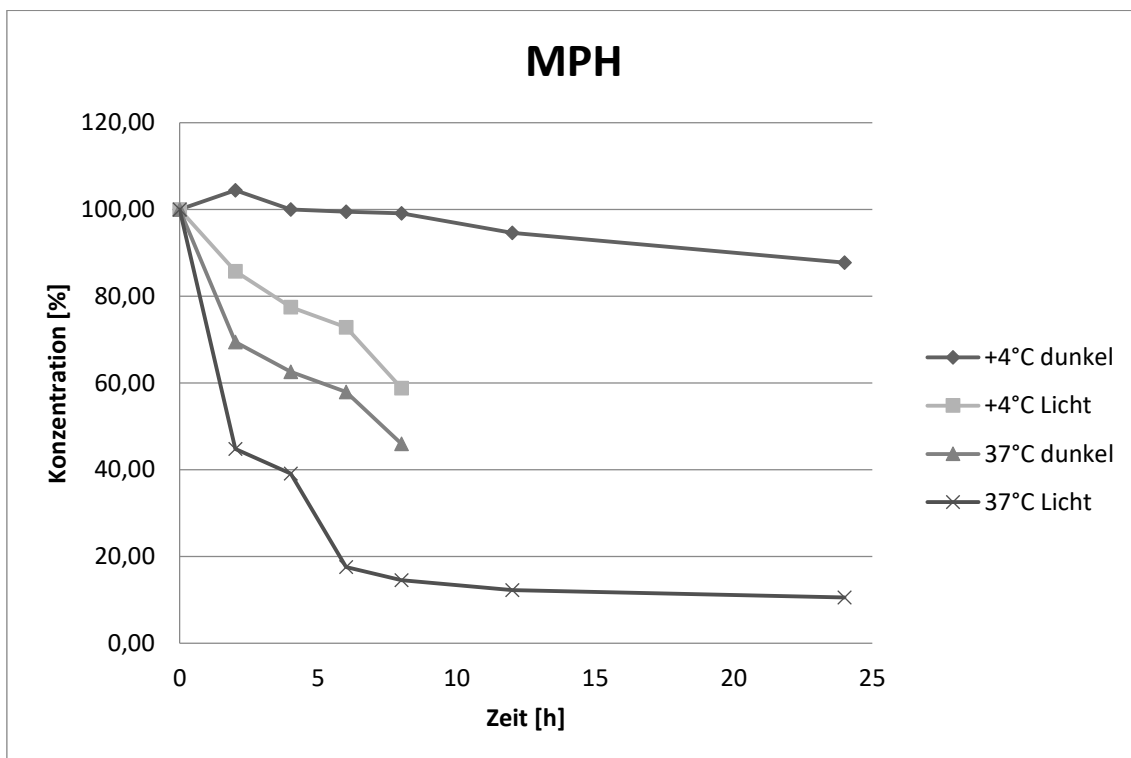


Abbildung 3: Einfluss von Licht und Temperatur auf die HWZ von MPH

(mit freundlicher Genehmigung von TDM-Labor Würzburg/Prof. Pfuhlmann/Burger und TDM-Labor Ulm/Prof. Gerlach/Burger)

In Abbildung 3 ist der Zerfall von gelöstem MPH in Abhängigkeit der Zeit unter Einfluss von Temperatur und Licht dargestellt. Man kann erkennen, dass sowohl höhere Temperaturen als auch Licht die Halbwertszeit (HWZ) von MPH senken. Da die Inkubationsbedingungen Dunkelheit und 37°C mit den Bedingungen im menschlichen Organismus übereinstimmen, muss der Einfluss von Licht und Temperatur nur in den vorbereitenden Arbeitsschritten berücksichtigt werden. Damit die Konzentration, mit der MPH auf die Lymphoblasten im Zellkulturmodell wirken soll, auch mit der Zielkonzentration im menschlichen Körper übereinstimmt, darf das Medium nicht für lange Zeit höheren Temperaturen oder Licht ausgesetzt sein. Dies spielt sowohl bei der Vorbereitung und Lagerung des Zellkulturmediums als auch beim Mediumwechsel eine wichtige Rolle und muss berücksichtigt werden. Die Hitze- und Lichtempfindlichkeit von MPH erfordert also ein schnelles Arbeiten auf Eis. Sowohl die 100 ml Mediumflasche als auch die 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße wurden mit Aluminiumfolie vor Lichteinfall geschützt. Sobald die Lösung aliquotiert war, wurden die Mikroreaktionsgefäße bei -80 °C gefroren. Die Zielkonzentration des Stocks von 10 µg/ml wurde zur Kontrolle bestimmt.

Vor der Inkubation der Zellkulturen wurde jeweils ein Aliquot unter Lichtschutz auf Eis aufgetaut und direkt vor der Inkubation in das auf 37 °C vorgewärmte Kulturmedium in entsprechender Menge überführt. Um eine homogene Verteilung zu erreichen, wurde die Kulturflasche mehrfach geschwenkt. Anschließend wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, bei dem genau die Hälfte des in der Kulturflasche schon vorhandenen Volumens entfernt und dieselbe Menge an MPH-Medium hinzugefügt wurde. Diese Volumenvorgabe war zur Einhaltung einer bestimmten MPH-Zielkonzentration in den Kulturflaschen unabdingbar.

2.2.9.1 MPH-Halbwertszeit unter Kultivierungsbedingungen

Zellkulturversuche stellen ein Modell dar, um biologische Prozesse im menschlichen Organismus nachzuempfinden. Für eine möglichst genaue Annäherung an die Gege-

benheiten in vivo, muss die MPH-Halbwertszeit unter Kulturbedingungen bekannt sein. Nur so kann man eine Medikamentendosierung und Inkubationsabstände festlegen. Um die Halbwertszeit unter Kulturbedingungen zu bestimmen, wurden aus dem angelegten Stock jeweils fünf Aliquots mit den Konzentrationen 10, 5, 2,5 und 1,25 µg/ml zur Kalibrierung hergestellt und bei -80 °C gefroren. Weitere 50 Aliquots mit der Konzentration 10 µg/ml wurden in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße pipettiert und bei 37 °C unter Lichtausschluss im Inkubator platziert. Zu den Zeitpunkten t₀-t₄₇ (anfangs Abstände von 15 min, die kontinuierlich erhöht werden) wurde je ein Tube bei -80 °C eingefroren, um einen weiteren Zerfall von MPH zu stoppen. Schließlich wurden alle MPH-Konzentrationen bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen.

2.2.9.2 Toxizitätstest

Um toxische Wirkungen von MPH auf die Lymphoblasten zu vermeiden, wurde vor der Versuchsreihe ein Vitalitätstest bei verschiedenen MPH-Konzentrationen durchgeführt. Die Zellkultur eines Probanden wurde in vier 25 ml-Kulturflaschen gesplittet und täglich mit den Konzentrationen 0, 5, 30 (die angestrebte Zielkonzentration der Versuchsreihe) und 100 ng/µl inkubiert. Da jeweils die Hälfte des vorhandenen Mediums entfernt und das gleiche Volumen an neuem Medium hinzugefügt wurde, musste das neue Medium zuvor mit doppelter MPH-Menge hergestellt werden. Es wurden also 0 bzw. 5 bzw. 30 bzw. 100 µl des Stocks in jeweils 5 ml Kulturmedium überführt und mit der Pipette gut gemischt. Alle zwei Tage wurde eine Zellzahlbestimmung mit kombiniertem Vitalitätstest durchgeführt.

2.2.9.3 Einfluss von MPH auf Zellzahl und Zellgröße

Da in vorausgehenden Testreihen ein durch MPH hervorgerufenen verändertes Wachstum beobachtet wurde, sollte der Einfluss von MPH auf die Parameter Zellzahl und Zellgröße der Lymphoblastenpopulationen quantitativ untersucht werden. Dazu wurden zwei ADHS- und zwei Kontrollgruppen mit Zelllinien von jeweils 9 Probanden gebildet. Die eine Hälfte wurde mit der für diese Versuchsreihe festgelegten Zielkonzentra-

tion von 30 ng/ μ l MPH im Medium inkubiert, die andere mit gewöhnlichem Medium. Zu den Zeitpunkten t₀=vor Inkubation, t₁=26h nach der ersten Inkubation (aber vor der zweiten), t₂= 32h nach der ersten bzw. 6h nach der zweiten Inkubation und t₃= 46h nach der ersten (in jedem Fall aber vor dem nächsten Mediumwechsel) wurden mit dem *Nexelcom Cellometer* nach einer Trypanblaufärbung Anzahl und Größe der vitalen Zellen bestimmt.

2.2.10 MPH-Inkubation

Nachdem alle 18 Kulturen, also 9 Kulturen von Patienten, 9 von Kontrollprobanden, eine Zellzahl von ca. 1 Mio. Zellen/ml erreicht hatten, wurde eine Subkultur in einer neuen Kulturflasche angelegt. Sobald alle Vergleichskulturen eine Zellzahl von ca. 4 Mio. Zellen/ml erreicht hatten, konnte die Inkubation mit MPH vorgenommen werden. Dazu wurde ein Kulturmedium mit einer MPH-Konzentration von 60 ng/ μ l hergestellt. Mit einer Pasteurpipette wurden 0,3 ml aus dem zuvor auf Eis unter Lichtausschluss aufgetautem Stockaliquot entnommen und in 50 ml 37 °C-warmes Kulturmedium überführt. Die Inkubation erfolgte wie der Mediumwechsel, allerdings waren die Entnahme der Hälfte des vorhandenen Mediums in den Kulturflaschen und der Ersatz durch dieselbe Volumenmenge an neuem Medium genau einzuhalten. Von jeder Kultur wurde jeweils eine Hälfte mit MPH-versetztem Medium inkubiert. Zu den Zeitpunkten t₀: vor MPH-Inkubation, t₁: eine Stunde bzw. t₂: sechs Stunden nach Inkubation mit frischem Medium, t₃: eine Woche bzw. t₄: zwei Wochen nach täglicher Inkubation mit frischem Medium wurden Zellen für die folgende RNA-Extraktion entnommen. Dabei wurden die Zellen auch zu den Zeitpunkten t₃ und t₄ eine Stunde nach Inkubation mit frischem Medium entnommen. Bei den Zeitpunkten t₁ und t₂ wurden zeitgleich mit der Zellentnahme 0,2 ml Mediumüberstand zur MPH-Konzentrationsbestimmung entnommen. In der Vorgehensweise wurde nicht zwischen MPH-behandelten und Kontrollkulturen unterschieden. Der Versuchsdurchführer arbeitete ohne Kenntnis des Probandenstatus (Patient vs. Kontrolle).

2.2.10.1 Zellentnahme und Zwischenlagerung

Für die RNA-Extraktion wurden jeweils 1,1 ml Zellen vom Boden der Kulturflasche mit einer Pasteurpipette entnommen. Davon wurden 1 ml in ein steriles 1,5 ml Mikroreaktionsgefäßüberführt, die restlichen 0,1 ml zur Zellzahlbestimmung in ein anderes. Die Zellen für die RNA-Extraktion wurden anschließend bei 700 rpm für 3 min zentrifugiert. Vom Überstand wurden vorsichtig 850 µl abgenommen, ohne das Zellpellet zu lösen. Anschließend wurde zu den übrigen 150 µl die fünffache Volumenmenge (750 µl) an *RNAprotect Cell Reagent* addiert und das Pellet sorgfältig mit Hilfe eines Vortexers gelöst. *RNAprotect Cell Reagent* enthält u.a. Tetradecyltrimethylammoniumoxalate, was der RNA-Präzipitation dient. Der Hersteller verspricht eine Stabilisierung der RNA, die eine Lagerung nicht degradierter, intakter RNA über mehrere Wochen bei -80 °C ermöglichen soll (EasyXpressHandbook).

2.2.10.2 RNA-Extraktion

Zum Großteil erfolgte die RNA-Extraktion direkt nach der Zellernte, nie jedoch länger als eine Woche danach. In der Zwischenzeit wurden die Zellen bei -80 °C gelagert. Für die RNA-Extraktion wurden die in *RNAprotect Cell Reagent* gelösten Zellen auf Raumtemperatur äquilibriert und 5 min bei 7300 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand komplett abpipettiert und die Zellen in 600 µl *RLT plus* Puffer mit β-Mercaptoethanol (10 µl/ml Puffer) mit Hilfe eines Vortexers gelöst. Der Puffer enthält Guanidthiocyanat, welches die Zellwände und Plasmamembranen der Zellen und Organellen zerstört. Des Weiteren kommt es zur Denaturierung und zur Zerstörung von RNAsen. Hochmolekulare Substanzen wie DNA und Zellkomponenten werden zerstückelt, was die Viskosität der Lösung verringert. Das war notwendig, damit die Membran der *gDNA Eliminator spin* Säule nicht verstopfen. Als Reduktionsmittel diente β-Mercaptoethanol, welches den RNA-Abbau während der Aufreinigung verhindert, indem es RNAsen irreversibel denaturiert. Dazu reduziert es Disulfidbrücken und zerstört damit die natürliche Konformation der Enzyme, die für ihre Funktionsweise notwendig ist. Das homogenisierte Lysat wurde auf eine *gDNA Eliminator spin* Säule aufgetragen,

die anschließend 30 s bei 10 000 rpm zentrifugiert wurde. Falls die Membran noch mit Flüssigkeit benetzt war, wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt. Die DNA befand sich dann im Filter, welcher entfernt werden konnte. Das Lysat enthielt die RNA und konnte mit 70 % Ethanol im Verhältnis 1:1 (600 µl) gemischt werden. Ethanol soll adäquate Bindungskonditionen zwischen RNA und der im folgenden Schritt verwendeten Säulenmembran ermöglichen. In zwei Schritten wurde nun jeweils die Hälfte dieser Lösung auf eine *RNeasy spin* Säule pipettiert, welche dann für 15 s bei 10 000 rpm zentrifugiert werden konnten. Nach jeder Zentrifugation wurde der Durchfluss verworfen. Anschließend wurden 700 µl *RW1* Puffer auf die Säule aufgetragen und erneut 15 s bei 10 000 rpm zentrifugiert. Dieser Puffer enthält ebenfalls Guanidthiocyanat und dient der Befreiung eventueller Kontaminationen. Wiederum wurde der Durchfluss verworfen und die Membran der *RNeasy spin* Säule mit 500 µl und anschließender 15-sekündiger Zentrifugation bei 10 000 rpm gewaschen. Dieser Schritt wurde allerdings mit einer Zentrifugationszeit von 2 min wiederholt. Falls der Filter nicht trocken war, wurde die Zentrifugation erneut durchgeführt. Der Filtereinsatz konnte dann in eine neue Sammelsäule gesetzt und 1 min bei 14 000 rpm trocken zentrifugiert werden. Anschließend wurde der Filtereinsatz in ein steriles 1,5 ml Eppendorf Röhrchen gesetzt und mit 50 µl RNase freiem Wasser beschichtet. Nach einer Wartezeit von 5-10 Minuten, in der sich die RNA vom Filter lösen sollte, erfolgte eine erneute Zentrifugation von 1 min bei 10 000 rpm. Die RNA befand sich dann im Durchfluss und musste sofort auf Eis gekühlt und anschließend bei -80°C gelagert werden (Debey-Pascher et al. 2012; Kit, n.d.).

2.2.10.3 Konzentrationsbestimmung und Überprüfung der RNA-Qualität

Für Verfahren wie cDNA-Synthese mit anschließender PCR oder Microarrays war es notwendig, die RNA-Konzentration der Proben zu kennen. Von den verschiedenen Quantifizierungsmöglichkeiten wurden in dieser Arbeit die Bestimmung mittels Photometrie, Gelelektrophorese, automatisierter Gelelektrophorese mit Mikroströmungstechnologie und *Bioanalyzer* verwendet. Mit diesen Verfahren konnte neben der Kon-

zentrationbestimmung auch die Reinheit und Integrität der Probe überprüft werden. Da jedes Verfahren seine Vor- und Nachteile hatte, war die Aussagekraft eines einzelnen Verfahrens zu gering. In Kombination ließen sich Konzentration, Reinheit und Integrität der Proben allerdings gut vorhersagen.

2.2.10.3.1 Spektrophotometer

Die spektrophotometrische Konzentrations- und Reinheitsanalyse von Nucleinsäuren basiert auf den unterschiedlichen Absorptionsmaxima von RNA, DNA und Proteinen sowie Verunreinigungen anderer Stoffklassen. Für Nucleinsäuren ist die Absorption ultravioletten Lichtes bei 260 nm Wellenlänge maximal hoch. Für die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin liegt dieses Maximum bei 280 nm. Diese Wellenlänge wird deswegen zur Proteinbestimmung genutzt. Andere Verunreinigungen erscheinen bei 230 nm (Joppien, Maier, and Wendling 2010).

Das Verhältnis aus den Absorptionswerten 260/280 nm gibt Rückschlüsse auf die Reinheit der RNA, wobei ein Wert von 1,8-2 als weitgehend proteinfrei betrachtet wird. Ein deutlich kleinerer Wert könnte Hinweis auf eine Verunreinigung mit Proteinen, Phenol oder anderen Kontaminanten sein. Da kleine pH-Veränderungen zum sauren bzw. basischen Bereich das Verhältnis um 0,2-0,3 verringern bzw. erhöhen, sollte ein möglichst einheitlicher pH-Wert unter den Proben erzielt werden. Ein weiteres Problem stellen kleine Verschiebungen der Wellenlänge dar. Zwar befindet sich die Absorption bei 260 nm auf einem Plateau, diesem folgt aber ein steiler Absorptionsabfall. So verändert eine Änderung der Wellenlänge von nur 1 nm das 260/280 Verhältnis um Werte von +/- 0,2. Außerdem ist zu beachten, dass die Zusammensetzung der Nucleotide den 260/280-Wert der Probe bestimmt. Einzeln gemessen erzielen sie sehr unterschiedliche 260/280 Verhältnisse. So erreicht Guanin 260/280 Werte von 1,15, Adenin von 4,5, Cytosin von 1,51, Uracil von 4,0 und Thymin von 1,47¹. Der gemessene Wert der gesamten RNA-Probe spiegelt ein gewichtetes Mittel dieser Einzelverhältnisse wider, hängt also von der Zusammensetzung der RNA ab. Ein angestrebter Wert von 1, 8-2

¹ Da die Aminosäure Thymin in RNA durch Uracil ersetzt wird, erreichen DNA-Proben verhältnismäßig höhere 260/280 Verhältnisse als RNA-Proben.

kann also nur als richtungweisend angesehen werden. Ein kleinerer Wert bedeutet nicht zwangsläufig eine Verunreinigung der Probe, auch ein unausgewogenes Basenpaarverhältnis könnte ursächlich sein (Thermo Scientific 2010).

Das Verhältnis 260/230 ist ein weiterer Indikator für die Reinheit der Nukleinsäure, wobei hier ein Wert von 1,8-2,2 angestrebt wird. Deutlich geringere Werte könnten Indikatoren für Kontaminanten mit Phenolaten oder organischen Salzen sein, welche das monochromatische Licht bei 230 nm maximal absorbieren.

Nach dem Lambert Beer-Gesetz gilt: Je mehr Licht von der Probe im Spektrophotometer absorbiert wird, d.h. je weniger Lichtintensität nach Probendurchlauf noch messbar ist, desto höher ist die Konzentration der jeweils wellenlängenspezifischen Substanz.

$$E(\lambda) = -\lg(I_1/I_0) = e\lambda * c * d$$

Dabei entspricht E der Extinktion bzw. Optischen Dichte (OD) bei Wellenlänge λ (nm), I_1 der Intensität des emittierten und I_0 der Intensität des eingestrahnten Lichts. Das Spektrophotometer misst also die Schwächung der Lichtintensität bei gegebener Wellenlänge und errechnet daraus mit Hilfe der Computersoftware die Extinktion. Unter Berücksichtigung des für jede Substanz spezifischen Extinktionskoeffizienten $e\lambda$ [$\mu\text{l}/(\text{ng}\cdot\text{cm})$] und der Schichtdicke² der Küvette d [cm], kann das Programm die Konzentration c [$\text{ng}/\mu\text{l}$] der Probe berechnen. Auch wenn bei der spektrophotometrischen Messung weder eine Aussage über die Integrität der RNA getroffen noch eine sensitive Differenzierung zwischen DNA und RNA vorgenommen werden kann, wird sie als Standardmethode zur schnellen und kostengünstigen Konzentrationsbestimmung eingesetzt. Dies hängt auch mit ihrer Messgenauigkeit zusammen, die bei fünffach reproduzierten Ergebnissen einer Abweichung von 2 % entspricht (Thermo Scientific 2010).

Vor der ersten Messung musste das Spektrophotometer *Nano Drop 1000* im Menüpunkt *nucleid acid* initialisiert werden, indem man 1 μl nukleasefreies Wasser auf die optische Oberfläche der unteren Plattform pipettierte und den oberen Hebelarm schloss. Anschließend äquilibrierte man das Gerät durch Auswahl des Buttons *blank*

² Diese fehlt bei der Messung mit NanoDrop, wird aber von der Software durch einen Faktor berücksichtigt.

mit dem Lösungsmittel, in dem die RNA gelöst wurde: hier nukleasefreies Wasser. Den bei dieser Messung ermittelten Wert nutzte die *NanoDrop*-Software als Referenzwert für die folgenden Probenmessungen. Zur Reinigung der optischen Oberfläche wurde nach jeder Probenmessung ein Laborwischtuch verwendet. Nun wurde die Option *RNA-40* eingestellt und die Messung erfolgte. Das Gerät ist in der Lage, Proben ab einem Detektierungsminimum von 2 ng/μl bis zu einer oberen Konzentrationsgrenze von 3000 ng/μl zu messen.

Von jeder RNA-Probe applizierte man mit einer manuellen Mikroliterpipette 1,5 μl auf das Zentrum der unteren Detektionsoberfläche. Der Hebelarm wurde geschlossen und die Messung durch Auswahl des Buttons *measure* gestartet. Die obere Plattform ist zur Einstellung der optischen Wellenlänge beweglich. Aufgrund der Oberflächenspannung bildet sich zwischen oberer und unterer optischer Plattform eine Flüssigkeitssäule. Dieses Prinzip dient der Fixierung der Probe, ohne dass Küvetten erforderlich sind. Der vertikale Strahlengang durch die Probe wird durch eine Xenonlichtquelle erzeugt. Mit Hilfe eines linearen *charged coupled devieve*-Feldes (CCD) erfolgte die Analyse des passierenden Lichtes. Nach erfolgreicher Messung wurden auf dem Bildschirm die Absorption bei 260 nm und 280 nm angezeigt. Außerdem errechnete die Software mit Hilfe des Lambert-Beer-Gesetzes das Verhältnis 260/280 und 260/230 sowie basierend auf der Absorption bei 260 nm die Konzentration der Probe.

2.2.10.3.2 Gelelektrophorese

Ein weiteres Standardlaborverfahren stellt die Gelelektrophorese dar. Durch Anreicherung des Gels mit dem Interkalationsfarbstoff Ethidiumbromid kann man nach elektrophoretischer Auftrennung der Probenbestandteile sowohl die Qualität über die Bandenposition als auch die Quantität über die Leuchtstärke der Banden beurteilen. Um eine adäquate Aussage treffen zu können, ist eine Probenmenge von ungefähr 200 ng erforderlich.

2.2.10.3.2.1 Herstellung eines Agarosegels

Zur Herstellung eines Agarosegels für die anschließende elektrophoretische Auftrennung von Nucleinsäuren wurde zunächst mit einer Feinwaage für ein 1,5 %-iges Gel zur RNA-Auftrennung 1,5 g Agarosepulver bzw. für ein 3 %-iges Gel zur cDNA-Auftrennung 3 g Agarosepulver abgewogen und in einem 250 ml Erlenmeyerkolben in 100 ml TAE-Puffer gelöst. Die Agarosekonzentration bestimmt die Porengröße des Gels, die wiederum die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle beeinflusst. Kleinere Moleküle wandern schneller zur Anode als größere. Da die RNA-Moleküle größer sind als cDNA Genabschnitte, wurde hier ein großmaschigeres Gel verwendet. Um den Siedeverzug während der ca. 1-minütigen Erwärmung bei 800 Watt in der Mikrowelle zu minimieren, wurde die Öffnung des Erlenmeyerkolben bis auf ein kleines Loch mit einer Klarsichtfolie verschlossen. War das Agarosegel noch nicht vollständig gelöst, wiederholte man die Erwärmung. Während das Gel im Anschluss erkaltete, musste es regelmäßig geschwenkt werden. Ab einer Temperatur von etwa 65 °C wurden ca. 3 µl Ethidiumbromid (EtBr) hinzugefügt. Hatte sich die rötliche Substanz gleichmäßig im noch flüssigen Gel verteilt, konnte es unter Vermeidung von Blasenbildung in Gelkammern gegossen werden. Dennoch vorhandene Blasen konnten mit einer Pipettenspitze weitgehend entfernt werden. In den Gelkammern befanden sich Kämmen, deren Zähne die Taschen im sich erhärtenden Gel formten. Eingeschlossene Luftblasen könnten die Molekülwanderung im Gel beeinflussen bzw. in Taschennähe eine Verbindung zwischen zwei Kammern und damit die Vermischung zweier Proben bewirken. Sobald die Gele fest waren, konnte man die Kämmen vorsichtig entfernen, die Gelkammer aus ihrem Block spannen und die neuen Gele entweder sofort verwenden oder zur Aufbewahrung in Folie verpacken und bei 9 °C kühlen.

2.2.10.3.2.2 Elektrophoretische Trennung

Um eine Gelelektrophorese durchführen zu können, wurden die Gelelektrophoresekammer zunächst mit TAE-Puffer gefüllt. Die in ihm enthaltenen Ionen ermöglichen die Stromleitung und infolgedessen die Molekülwanderung. Die TAE-Pufferkapazität von

pH 7.2-9.0 liegt in einem Bereich, in dem Enzyme nicht inhibiert werden, weswegen TAE-Puffer bei vielen molekularbiologischen Methoden eingesetzt wird. Der EDTA-Zusatz schützt Nukleinsäuren vor Degradation, da die für Nukleasen notwendigen Cofaktoren (oft zweiwertige Kationen) von ihm gebunden werden (Joppien, Maier, and Wendling 2010). In diese ionische Pufferlösung platzierte man dann das Gel. In die äußeren Taschen des Gels pipettierte man eine Leiter: bei RNA eine 1 kb-, bei cDNA eine 100 bp Leiter. Diese enthielt Nukleinsäurefragmente bekannter Größe, die durch einen späteren Vergleich, eine Abschätzung der Probenfragmentlängen ermöglichten. Das größte Fragment der Leiter war 1 kb (bzw. 100 bp) groß, darauf folgten in einem Abstand von jeweils 100 kb kürzere Fragmente. Bevor die Proben in die Taschen pipettiert werden konnten, mussten sie mit einem 6-fach H₂O-verdünnten Blaupuffer versetzt werden. Dieser erschwert die Probenfragmente um ca. 500 bp, was ihre Diffusion aus den Taschen verhindert. Außerdem ermöglichte er, die Lauffront der Proben im Gel zu verfolgen und so den Zeitpunkt festzustellen, an dem eine ausreichende Trennung erreicht war. Nach Anlegen einer Spannung von 100V³ beginnen die Moleküle aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode zu wandern. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der RNA, was sein Absorptionsspektrum verändert und die Fluoreszenz nach UV-Bestrahlung verstärkt. So erschienen die Gelbereiche, in denen sich RNA befindet, unter UV-Anregung als hell aufleuchtende Banden, während das übrige Gel dunkel erschien. Dadurch konnte man während der elektrophoretischen Auftrennung mit einer UV-Lampe den Auftrennungsgrad der Proben beobachten. Wenn die Proben ausreichend aufgetrennt waren, spätestens aber wenn die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Spannungsquelle ausgeschaltet. Es ist zu beachten, dass die Laufrichtung des Kations EtBr derjenigen der anionischen Nukleinsäuren entgegengesetzt ist. Zu einem bestimmten Zeitpunkt kreuzen deswegen die kleinsten Nukleinsäurefragmente die EtBr-Lauffront. Danach entfärbt sich die DNA wieder und verblasst, weswegen man zu lange Laufstrecken vermeiden sollte (Schmitz 2011) Zur Begutachtung wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen und im dafür vorgesehenen Schub des *ChemiDoc* platziert.

³ Richtwerte von 0. 5-10 V/cm Elektrodenabstand

2.2.10.3.2.3 Visualisierung mit *ChemiDoc*

Der *ChemiDoc* ist ein bildgebendes Verfahren, mit dem man durch UV-Licht angeregtes Material visualisieren kann. Zunächst musste man das Gel per Hand in den Fokus der CCD-Kamera bringen, was man durch die Funktion *Live focus* auf dem Bildschirm überprüfen konnte. Dann wurde die Tür des *ChemiDocs* geschlossen und die Helligkeit mit der *Iris*-, der Kameraausschnitt mit der *Zoom*- sowie die Bildschärfe mit der *Focus*-funktion angepasst. Mit der Funktion *Freeze* wurden diese Einstellungen beibehalten. Das Gel konnte nun durch Auswahl der Funktion *Trans-UV* mit UV-Licht der Wellenlänge 302 nm beleuchtet werden. Diese Wellenlänge entsprach dem Absorptionsmaximum von EtBr. Mit der Funktion *Manual Exposure* konnte man Helligkeit und Kontrast des aufgenommenen Bildes verändern und mit dem *Texttool* Beschriftungen hinzufügen (Bio-Rad 2013).

Die Anzahl der Banden spiegelt die in der Probe enthaltenen unterschiedlichen Produkte wider. Moleküle des gleichen Produktes befinden sich in derselben Bande, wohingegen das Aufleuchten mehrerer Banden die Existenz verschiedener Produkte verrät. Die Größe der Probenfragmente kann man durch Vergleich der Bandenposition mit den Nukleinsäureleiterbanden abschätzen. Die Nukleinsäuremenge ist proportional zur Lichtintensität der Banden. Verunreinigungen erscheinen als schwach gefärbte Schlieren. Mit Hilfe der Gelelektrophorese lassen sich also Aussagen über die Art der Nukleinsäure (RNA, gDNA, cDNA) sowie Verunreinigungen treffen. Konzentrationen kann man allerdings nur schätzungsweise bestimmen. RNA Proben erzeugen zwei Banden: die große 28S und kleine 18S Untereinheit des eukaryotischen Ribosoms. Aus dem Verhältnis der Bandendicke kann die RNA-Integrität bestimmt werden, wobei ein 28S/18S Verhältnis von ca. 2 ein Indikator für intakte RNA sein soll (Denisov et al. 2008). Auch bei cDNA Proben kann es zum Auftreten mehrere Banden kommen. Dies ist zum Beispiel dann der Fall, wenn sich ein Primer nicht nur an eine spezifische RNA-Position anlagert sondern die Synthese mehrerer Genabschnitte ermöglicht.

2.2.10.3.2.4 Automatisierte Gelelektrophorese

Das von Experion automatisierte Elektrophoresesystem ermöglichte es, Konzentration, Integrität und Degradationsstatus sehr kleiner RNA-Mengen von wenigen pg/ μ l zu erfassen. Gerade der Degradationsstatus ist ein wichtiger Parameter für quantitative RNA-Untersuchungen wie zum Beispiel der qRT PCR. Teilweise degradierte RNA-Proben mit unterschiedlichen Degradationsstatus führen zu variablen und falschen Ergebnissen. Zur Messung wurde ein LabChip mit integriertem Kapillarsystem verwendet, in dessen Mulden jeweils 12 Proben pipettiert wurden. In der automatisierten Gelelektrophoresestation wurde eine Spannung angelegt, die Mikroströmungen generiert und für die Auftrennung der Proben entsprechend ihrer molekularen Masse sorgt. Die zugehörige Software analysierte anhand einer Fluoreszenzmessung die RNA-Konzentration und berechnete auf Grundlage eines bestimmten Algorithmus den RNA-Qualitäts-Index (RQI) (Liu et al. 2000).

Die Durchführung der Messung erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Zur Vorbereitung wurden alle Reagenzien des *RNA StdSens Kits* für mindestens 15 min auf Raumtemperatur äquilibriert. 600 μ l RNA-Gel wurden in ein *spin filter tube* pipettiert und 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. 65 μ l des Filtrats wurden mit 1 μ l RNA Färbelösung versehen und mit einem Vortexer gemischt. Die Elektroden des Elektrophoresesystems wurden zunächst 2 min mit 800 μ l *Experion electrode cleaner* und dann 5 und noch einmal 2 min mit 800 μ l DEPC-Wasser in zwei Säuberungschips gereinigt. DEPC bindet kovalent an primäre und sekundäre Amine, was Enzyme inhibiert. Mögliche Kontaminationen mit RNAsen sollten dadurch beseitigt werden.

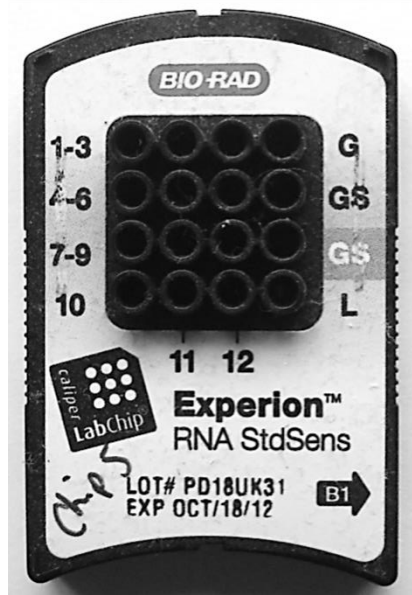


Abbildung 4: Experion RNA StdSens LabChip

Bevor der Chip für etwa 30 s in die *Priming station* gesetzt wurde, füllte man das *orange GS-well* mit 9 μ l der zuvor vorbereiteten Färbelösung. Diese wurde im Programm *B1* unter Druck in das Mikrokapillarsystem des Chips gesogen. Durch die Verbindung zwischen Kapillarsystem und Probenvertiefungen befand sich nun am Boden jedes Probenwells sowohl das Gel, das als Elektrophoresesieb diente, als auch der Fluoreszenzfarbstoff zur Anfärbung der RNA. Dann wurden 9 μ l derselben Lösung in die schwarz beschriftete *GS-Vertiefung* bzw. 9 μ l reines Gel in die mit *G* beschriftete Vertiefung pipettiert. Alle anderen Vertiefungen wurden mit 5 μ l *loading* Puffer gefüllt. Dieser enthält einen Marker bekannter Größe, den die Software später als Referenzwert zum Abgleich mit der Leiter verwendet. Sowohl 3 μ l der 12 RNA-Proben als auch der RNA-Leiter wurden in einem sterilen 1,5 ml *Mikroreaktionsgefäß* für 2 min bei 70 °C in einem Thermomixer denaturiert und sofort danach auf Eis gekühlt. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt von wenigen Sekunden wurden je 1 μ l Probe bzw. Leiter in die dafür vorgesehene Vertiefung pipettiert und anschließend auf der Vortex Station für 1 min durchmischt. Jetzt konnte man den Chip in die Gelelektrophoresestation setzen. Durch Schluss des Deckels wurden die Elektroden in die Vertiefungen gesenkt und mit den jeweiligen Substanzen in Kontakt gebracht. Durch Aktivierung der Funktion *starting*

a new run wurde eine Spannung von maximal 2.2 V angelegt, die von der Software an die Probeneigenschaften angepasst wurde. Entsprechend ihrer Ladung wurden die Moleküle in die Separationskanäle des Chips gezogen. Die Molekülmasse bestimmt die Wanderungsstrecke. Das Fluoreszenzfärbemittel interkalierte zwischen die RNA-Basen, wurde durch einen Laser mit 635 nm Wellenlänge angeregt und anschließend von einer Photodiode detektiert. Die *Experion* Software ermittelte die Leuchtintensität und trug sie als Funktion in Abhängigkeit der Zeit auf (s. Abbildung 5).

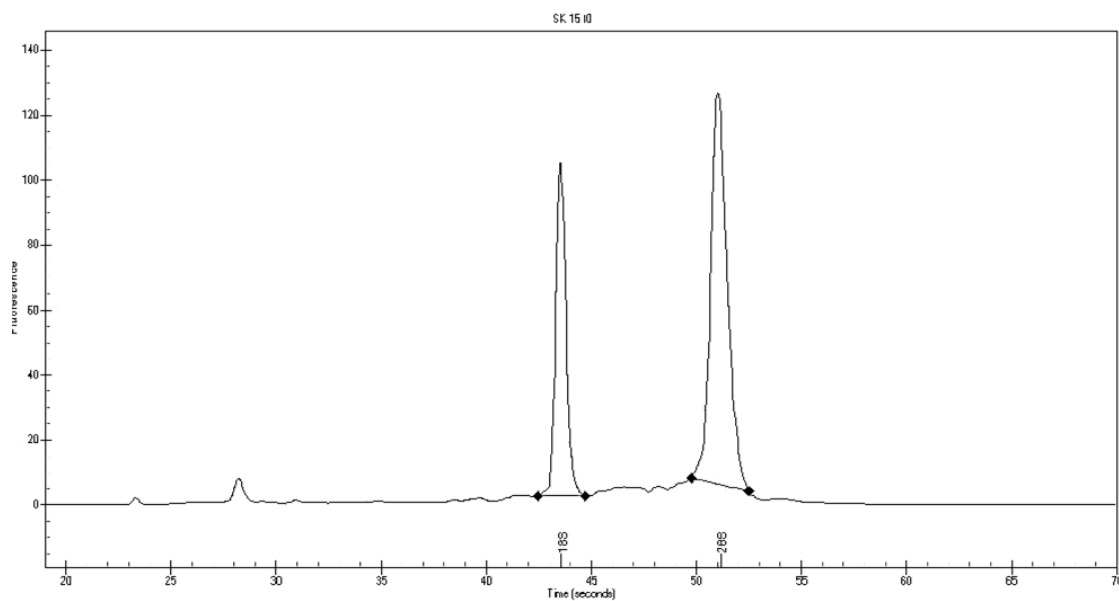


Abbildung 5: *Experion*: Elektropherogramm

Dieses Elektropherogramm besitzt zwei große Spitzen, welche die große 28 S und kleine 18 S Untereinheit des eukaryotischen Ribosoms widerspiegeln, sowie eine kleinere Spitze vor der 18 S Spitze, die ein Degradationssignal darstellt. Degradierete RNA hat ein kleineres Molekulargewicht, bewegt sich deswegen schneller im Gel und erscheint zu Beginn des Graphen noch vor den 18 S und 28 S-Signalen. Um einen Degradationsstatus zu bestimmen, wurde ein Verhältnis aus Degradations- und 18 S-Signal gebildet, mit Referenzwerten degradiertes RNA verglichen und anhand einer RQI-Skala von 1 (vollständig degradiert) bis 10 (intakt) bewertet. Voraussetzung für die Berechnung war, dass die 18 S und 28 S sowie die Spitze vor dem 18 S-Signal richtig identifiziert wurden. Falls die Software diese Punkte nicht richtig bestimmt hat, war eine manuelle Nachjust-

tierung möglich. Die Konzentrationsbestimmung geht aus der Berechnung der Fläche unter dem Graphen hervor. Außerdem wurde ein virtuelles Gelbild generiert.

Da auch schon kleine Luftblasen ausreichten, um den Flüssigkeitsstrom in den Mikrokanälen oder die Durchmischung der Proben zu behindern, war bei jedem Pipettiervorgang in die Vertiefungen des *LabChips* ein langsames sorgfältiges Arbeiten erforderlich. Außerdem sollte man stets überprüfen, ob sich evtl. doch Luftblasen gebildet hatten, damit man sie nötigenfalls mit einer Pipettenspitze entfernen konnte.

2.2.10.3.2.5 Bioanalyzer

Eine andere Methode zur Bestimmung der RNA-Integrität stellte der *Aligent 2100 Bioanalyzer* dar. Als Berechnungsgrundlage nutzte auch diese Software ein Elektrophoreseprofil. Im Unterschied zu *Experion* wurden allerdings anhand des *Bayesian learning networks* 8 Parameter analysiert, u.a. Verhältnis aus rRNA Spitze bzw. schnell gelaufenen RNAs und Gesamtfläche des Elektropherogramms, Höhe der 18S rRNA Spitze und des integrierten Markers. Aus diesen wurde die sogenannte RNA Integrity Number (RIN) bestimmt, die ebenfalls Werte von 1 (maximal degradierte RNA) bis 10 (intakte RNA) annehmen konnte. Die Korrelation zwischen RQI und RIN beträgt 94% (Denisov et al. 2008). Da dieses Verfahren in einem anderen Labor durchgeführt wurde, wird in dieser Arbeit auf eine detailliertere Beschreibung verzichtet.

2.2.10.4 Microarray

Die hypothesenfreie Microarray Untersuchung der isolierten RNA wurde in Kooperation mit Dr. Claus-Jürgen Scholz, IZKF Microarray Unit, Universität Würzburg durchgeführt. Daher folgt hier nur eine kurze Beschreibung der Methodik. Eine Möglichkeit, die Genexpression vieler RNA-Proben gleichzeitig zu untersuchen, ist der Microarray. Bei diesem Verfahren müssen die RNA-Proben zunächst in cDNA umgeschrieben und mit Fluoreszenzfarbstoffen (meist Cyanin 3 und 5) markiert werden (Joppien, Maier, and Wendling 2010). Anschließend werden sie auf eine Trägerplatte pipettiert, in deren Vertiefungen – sogenannte *Spots* – sich DNA-Sonden befinden. Diese Sonden enthal-

ten DNA-Gensequenzen, die komplementär zu den Probensequenzen sind. Befindet sich ein passender Genabschnitt in der cDNA-Probe, wird er gebunden. Die fluoreszierende Probe kann durch anschließende Waschschriffe nicht von der Trägerplatte gelöst werden. Leuchtet ein Spot unter Anregung mit UV-Licht auf, ist das entsprechende Gen in der Probe exprimiert, wobei die Fluoreszenzintensität eine relative Quantifizierung der Genexpression ermöglicht.

Da dieses Verfahren sehr kostenintensiv ist, wurde es nicht für jede Probe einzeln durchgeführt. Stattdessen wurden vier Probenpools angelegt, die aus jeweils sieben RNA-Proben zusammengemischt wurden: Pool 1: t0 ADHS-Patienten; Pool 2: t0 Kontrollen; Pool 3: t4 ADHS-Patienten und Pool 4: t4 Kontrollen. Durch Vergleich der beiden t0-Pools ist es möglich, Genexpressionsunterschiede zwischen ADHS-Patienten und Kontrollprobanden ohne MPH-Einfluss zu detektieren. Wenn man diese Pools mit denen vom Zeitpunkt t4 vergleicht, kann man die Wirkung, die MPH auf die Genexpression hat, analysieren und ggf. Unterschiede in der MPH-Wirkung zwischen gesunden und kranken Probanden detektieren; für Details siehe Tabelle 8.

Tabelle 8: Probenpooling

Nummer	Code	ng/μl	260/280	260/230	
1	SK 35 t0	330,3	2,03	1,63	Pool 1: ADHS-Zellen ohne MPH- Inkubation zum Zeitpunkt t0
2	SK 36 t0	461,5	2,02	1,89	
3	SK 37 t0	636,3	2,07	1,84	
4	SK 42 t0	403,1	2,04	1,9	
5	SK 47 t0	517,1	2,07	1,87	
6	SK 122 t0	451,9	2,04	1,91	
7	AR 714 +MPH t0	475	2,03	1,9	
8	SK 15 t0	527,4	2,08	2,19	Pool 2: Kontroll-Zellen ohne MPH- Inkubation zum Zeitpunkt t0
9	SK 20 t0	454,3	2,02	1,82	
10	SK 30 + MPH t0	424	2,03	1,53	
11	SK 50 t0	322,2	2,06	1,91	
12	SK 52 t0	448,5	2,02	1,94	
13	SK 53 t0	476,2	2,03	1,89	
14	SK 142 t0	337,2	2,05	1,81	

15	SK 35 + MPH t4	288,9	2,06	1,66	Pool 3: ADHS-Zellen nach MPH- Inkubation zum Zeitpunkt t4
16	SK 36 +MPH t4	317	2,06	1,78	
17	SK 37 +MPH t4	294,7	2,07	1,82	
18	SK 42 +MPH t4	274,1	2,07	2,03	
19	SK 47 +MPH t4	256,5	2,06	1,88	
20	SK 122 +MPH t4	258,7	2,08	1,82	
21	AR 714 +MPH t4	255,9	2,07	1,87	
22	SK 15 + MPH t4	272,9	2,07	1,47	Pool 4: Kontroll-Zellen nach MPH- Inkubation zum Zeitpunkt t4
23	SK 20 +MPH t4	267,01	2,08	1,9	
24	SK 30 + MPH t4	122,3	2,04	1,9	
25	SK 50 +MPH t4	273,9	2,07	1,84	
26	SK 52 +MPH t4	211,5	2,09	1,99	
27	SK 53 +MPH t4	321,6	2,06	2,12	
28	SK 142 +MPH t4	284,3	2,06	1,81	

Für den Microarray wurden 100ng RNA aus jedem Probenpool mit Hilfe von in vitro Transkription amplifiziert, unter Verwendung des 3'-IVT Express Kit mit Biotin fragmentiert und markiert und anschließend auf humane GeneChip Genom U133 Plus 2.0 Microarrays nach Anleitung des Herstellers (Affymetrix, Santa Clara, CA) hybridisiert.

Die Rohdaten wurden einer Varianz-stabilen Normalisierung (VSN) unterzogen. Die Zusammenfassung der Expressionswerte wurde in Bezug zu perfekt aufeinander abgestimmten Proben mit dem Medianpolish Algorithmus, der in der im Robust Multiarray Avarage (RMA) integriert ist, durchgeführt. Differenziell exprimierte Gene wurden mit dem Linear Model for Microarray Data (LIMMA) in einem Modell für gepaarte Daten ermittelt, in dem Gruppen- und Behandlungseffekte bewertet werden können. Das globale Signifikanzniveau wurde auf eine False Discovery Rate (FDR) < 0,05 festgelegt (C.-J. Scholz, persönliche Kommunikation).

2.2.10.5 cDNA-Synthese

Nicht nur für den Microarray, sondern auch die qRT PCR muss das Ausgangsprobenmaterial in DNA-Form vorliegen. Das zur Amplifikation der Nukleinsäuren benötigte Enzym DNA-Polymerase kann als Matrize ausschließlich DNA verwenden. Die isolierte RNA wird deswegen in einem vorgeschalteten Verfahren mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Dieses Enzym nutzt RNA als Matrize zur DNA Synthese, arbeitet also genau entgegengesetzt zu den Transkriptionenzymen und erhält deswegen seinen Namen. Die synthetisierte cDNA unterscheidet sich von der DNA durch das Fehlen der Intronsequenzen, da diese in der RNA-Matrize nicht vorhanden sind.

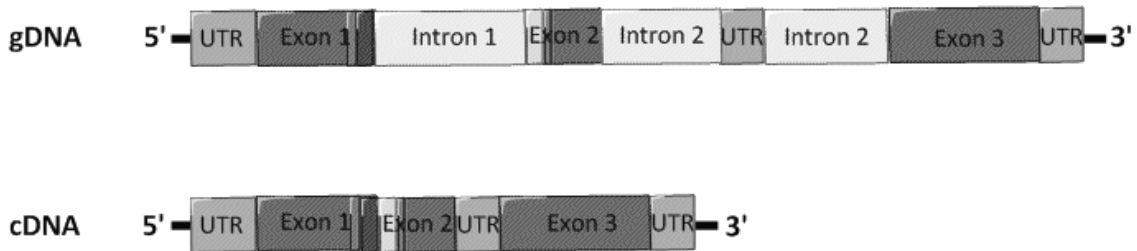


Abbildung 6: cDNA

Für dieses Verfahren wurde das *iScriptTM* cDNA Synthese Kit der Firma BioRad verwendet. Die im *iScriptTM* enthaltene modifizierte reverse Transkriptase entstammt dem MML-Virus. Ihre Modifikation beläuft sich u. a. auf einer Entfernung der intrinsischen Hydrolase-Aktivität. So ist es ihr nicht mehr möglich, angelagerte RNA-Primer hydrolytisch wieder abzuspalten. Noch vorhandene RNase-Aktivitäten wurden durch den beigegefügt RNase-Inhibitor gehemmt. So stehen mRNAs länger als Matrizen zur Verfügung. Auch wenn beide Mechanismen zu deutlich längeren Transkripten führen, kann die RT nur Produkte bis zu einer Länge von 1 kb synthetisieren (Bio-Rad n.d.).

Des Weiteren enthielt das Kit einen *iScript reaction mix* mit einer Mischung aus einem zum Poly-A-Schwanz der mRNA komplementären Oligo(dT)Nukleotid- und Hexamerprimer für die DNA-Synthese. Da viele mRNAs die maximal erzeugbare Produktlänge der Transkriptase von 1 kb überschreiten, nutzt man eine Mischung aus zufällig zusammengesetzten Hexamerprimern. Diese lagern sich an unterschiedliche Regionen der mRNA an, sodass am Ende der Reaktion sowohl alle mRNA-Bereiche als auch alle anderen RNAs in Form von cDNA abgeschrieben sind.

Anhand des Herstellerprotokolls für die cDNA-Synthese wurden nach entsprechender Volumenberechnung 500 ng jeder RNA-Probe in ein steriles 0,2 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Da sich die Konzentration der Proben und damit auch das Volumen, in dem 500 ng RNA enthalten waren, unterschied, wurden die zu verwendenden Probenmengen bis zu einem Volumen von 40 µl mit Nuklease freiem Wasser ergänzt. Zusätzlich wurden jeweils 8 µl *iScript reaction mix* und 2 µl reverse Transkriptase hinzugefügt. Die Reaktionsgefäße wurden in einen Thermocycler gesetzt, in dem die Proben in drei Zeitintervallen von 5, 30 und 5 min unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt wurden. Zu Beginn lagern sich bei 25 °C die Primer an die RNA an. Das zweite und längste Zeitintervall bei 42 °C dient der cDNA-Synthese. Bei dieser Temperatur können die Sekundärstrukturen der RNA besser überwunden werden und die RT, deren Optimum bei 37 °C liegt, gerade noch arbeiten. Am Ende wird die RT bei 85 °C denaturiert, was die Reaktion beendet. Zu jedem Ansatz wurden dann noch 160 µl TE-Puffer hinzugefügt, um ein größeres Ausgangsvolumen für die anschließende quantitative Real Time PCR zu erreichen. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gekühlt.

2.2.10.5.1 Überprüfung der cDNA auf gDNA-Kontamination

Die Gelelektrophorese wurde primär dazu verwendet, die Qualität und Spezifität der Primer, aber auch die Reinheit der Kontrollproben zu überprüfen. cDNA unterscheidet sich von gDNA durch das Fehlen von Introns. Deswegen sind cDNA Moleküle in der Regel sehr viel kürzer. Enthielt eine Probe neben der neu synthetisierten cDNA gDNA-Verunreinigungen, konnte man im Gelbild eine zweite scharf begrenzte spezifische

Bande oberhalb der cDNA-Bande erkennen. Da die Gelelektrophorese für kleine Molekülmengen ungeeignet ist, wurde dieser Nachweis nach einer Vervielfältigung durch PCR durchgeführt. Abbildungen von den angefertigten Gelbildern befinden sich im Anhang (s. Abbildung 28 bis Abbildung 35). In Abbildung 31 liegt bei TBP und TFRC eine Verunreinigung der Negativproben vor, die bei wiederholter Testung allerdings verschwanden. Da bei den Genen B2M (s. Abbildung 30) und YWHAZ (s. Abbildung 35) auch die gDNA-Probe ein Produkt ergab, galten die Primer als unspezifisch und wurden aussortiert.

2.2.10.6 Quantitative Real Time PCR

Die quantitative Real Time PCR ist eine Methode zur quantitativen Genexpressionsanalyse. Nach einem bestimmten Protokoll wird durch den jeweils ausgewählten Primer ein spezifisches Genprodukt der cDNA mehrfach amplifiziert. Es wird ein fluoreszierender Farbstoff beigemischt, der sich zwischen die DNA-Stränge anlagert. Nach jedem Amplifikationszyklus – daher der Name Real Time – wird die Fluoreszenz der Probe bestimmt. Diese ist proportional zur amplifizierten DNA-Probenmenge, sodass man die Menge der gebildeten Produkte direkt ablesen kann. Man geht davon aus, dass sich die DNA-Menge in jedem Amplifikationsschritt ungefähr verdoppelt. Deswegen kann man am Ende zurückschließen, in welcher Menge das gesuchte Gen in der ursprünglichen Probe exprimiert wurde. Zur Berechnung nutzt man den CT-Wert (threshold cycle). Er gibt die Zykluszahl an, ab dem der Schwellenwert erreicht ist, bei dem ein Fluoreszenzsignal registriert werden kann.

Vorbereitend wurden die zu verwendenden Reagenzien und cDNA-Proben auf Eis aufgetaut, mit dem Vortexer homogenisiert und anschließend kurz mit einer Mikrozentrifuge an den Gefäßboden zentrifugiert. Zu 2 µl des jeweiligen cDNA-Templates (entspricht 500/40= 25 ng RNA) wurden 6 µl steriles Wasser, 2 µl Primer sowie 10 µl *iQ SYBR Green Supermix* zusammen pipettiert, gevortext, zentrifugiert und nach einem vorher festgelegten Schema (s. Tabelle 14-17) in die Mulden der Reaktionsplatte pipettiert. Diese wurde mit einer Folie beklebt, für 30 s bei 4680 rpm zentrifugiert und dann

in den *iCycler* gesetzt, um das ausgewählte Programm zu durchlaufen. Es beinhaltet den Amplifikationszyklus, die Fluoreszenzmessung und eine Schmelzkurvenerfassung.

Der *iQ SYBR Green Supermix* enthält den Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green I*, 50 U/ml *iTaq DNA Polymerase*, dNTPs (jeweils 0,4 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 6 mM MgCl₂, 40 mM Tris-HCl pH 8,4, 100 mM KCl, Stabilisatoren sowie 20 nM eines weiteren Fluoreszins, um den Well-Faktor der jeweiligen Platte zu erfassen (Bio-Rad 2009).

SYBR Green ist ein Cyanin-Farbstoff, der unspezifisch zwischen DNA-Doppelstränge bindet. Er absorbiert blaues Licht mit einem Maximum bei 494 nm Wellenlänge. Sein Emissionsmaximum von grünem Licht liegt bei 521 nm. Der Farbstoff produziert auch in freier Lösung sowie gebunden an RNA oder einzelsträngiger DNA ein Fluoreszenzsignal. Dieses ist aber aufgrund seiner sehr viel geringeren Stärke von etwa 1/1000 des ds-DNA-Signals zu vernachlässigen. Doppelsträngige DNA liegt während der Annealing- und Elongationsphase vor und kann deswegen nur hier detektiert werden (Bio-Rad 2009).

Die *iTaq DNA Polymerase* wird in ihrer Funktion zunächst von einem Antikörper blockiert, der während des Denaturierungsschrittes allerdings zerstört wird und eine vollständig funktionsfähige Polymerase zurücklässt. Ihr Aktivitätsmaximum wird bei einem pH von 8 erreicht, der durch den im Supermix enthaltenen Tris-HCl-Puffer gewährleistet wird. Neben den Substraten, die in Form von Desoxynukleosidtrisphosphaten vorliegen benötigt sie Magnesium-Ionen als Cofaktor. Diese sind auch für die Auftrennung der Doppelstränge und die Primeranlagerung notwendig und deswegen Bestandteil des Supermix (Schmitz 2011).

2.2.10.6.1 Primerauswahl

Obwohl mögliche Verunreinigungen mit gDNA durch diverse Reinigungsschritte (s.o.) beseitigt sein sollten, wurden für die qRT PCR Intron überspannende Primer ausgewählt. Diese besitzen eine DNA-Sequenz die komplementär zu einem Exon-Exon Übergangsbereich ist. Da gDNA noch Intronbereiche zwischen den Exons enthält, können

sich Intron überspannende Primer nicht an sie anlagern. Im Gegensatz dazu fehlen bei cDNA diese Intronbereiche, da sie nach einer RNA-Matrize synthetisiert worden ist.

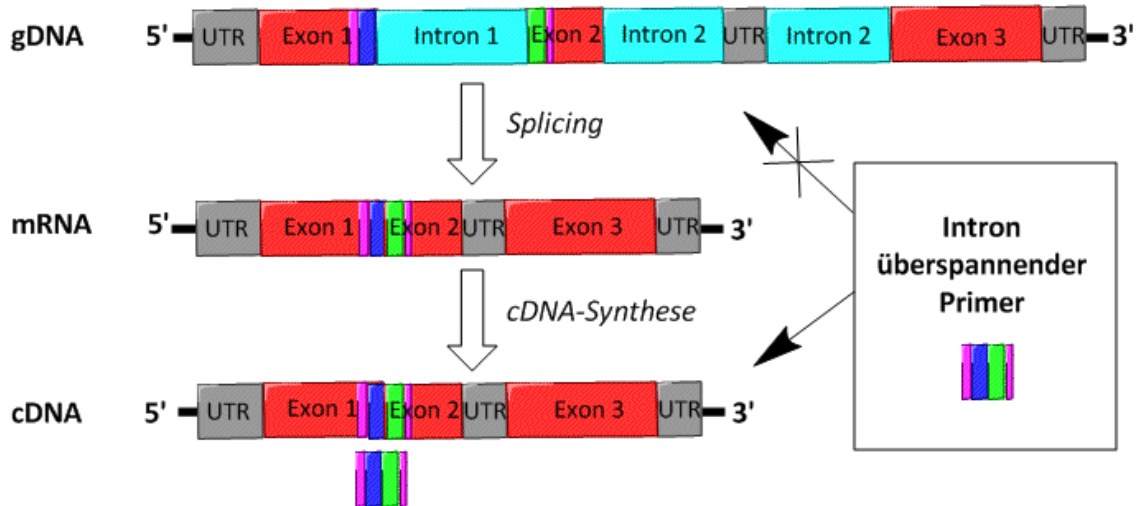


Abbildung 7: Intronüberspannender Primer

2.2.10.6.1.1 Zielgene

Die Auswahl der Zielgene erfolgte auf Grundlage der Microarray Ergebnisse und unter Berücksichtigung des über die jeweiligen Gene bereits bekannten Kontextes psychiatrischer Erkrankungen und ihrer Pharmakotherapie. So wurden *ATXN1*, *GLUT3*, *GUCY1B3*, *HEY1*, *MAP3K8* und *NAV2* für die weitere Untersuchung mittels qRT PCR ausgewählt. Eine genaue Beschreibung der Gene befindet sich im Ergebnisteil.

2.2.10.6.1.2 Referenzgene

Neben den beschriebenen Primern für die Zielgene wurden in der qRT PCR auch Primer für Referenzgene, sogenannte *Housekeeping*-Gene, eingesetzt. Dies sind Gene, die für grundsätzliche Struktur- oder Stoffwechseleigenschaften kodieren und deswegen in allen Proben gleichermaßen vorhanden sein sollten. Sie dienten als Referenzwerte für die Genexpressionsanalyse. Für diese Arbeit wurden die Referenzgene *ALAS1*, *GUSB*, *HPRT1*, *SDHA2*, *TBP*, *TFRC*, *B2M* und *YWHAZ* verwendet, die nachfolgend auf Grundlage

der Beschreibungen der NCBI-Gendatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) kurz charakterisiert werden sollen.

ALAS1: Die δ -Aminolevulinsäuresynthase 1 ist ein mitochondriales Enzym, das den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Hämbiosynthese katalysiert.

GUSB: Die Glucuronidase β stellt eine Hydrolase dar, die Glycosaminoglykane wie Heparinsulfat, Dermatan-sulfat und Chondroitin-4,6-Sulfat spaltet. Sie ist in den Lysosomen lokalisiert.

HPRT1: Die hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1 katalysiert die Bildung von Inosinmonophosphat aus Hypoxanthin und Guanidinmonophosphat aus Guanin, dabei überträgt es die 5-Phosphoribosylgruppe von 5-Phosphoribosylpyrophosphat. Die Bildung dieser Produkte ist Bestandteil des Salwege-Pathways in der Purinnukleotidsynthese.

SDHA2: Der Succinatdehydrogenase Komplex (Untereinheit A) ist Teil der mitochondrialen Atmungskette. Er besteht aus mehreren Untereinheiten, die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind.

TBP: Das TATA-Box-Bindeprotein ist an der Initiation der Transkription durch die RNA-Polymerase II beteiligt. Am N-Terminus besitzt TBP eine Reihe von Glutaminresten, die die DNA-Bindungsaktivität am C-Terminus modulieren und damit die Transkriptionsrate steuert.

TFRC: Der Transferrinrezeptor bindet Transferrin, welches anschließend endozytotisch in die Zelle aufgenommen werden kann.

B2M: Das Serumprotein Beta-2-Mikroglobulin bildet zusammen mit MHC I die schwere Kette, die sich auf fast allen kernhaltigen Zellen befindet. Es besitzt eine β -Faltblatt-Struktur und kann im pathologischen Kontext Amyloidfibrillen formen.

YWHAZ: Das Tyrosin-3-Monooxygenase/Tryptophan-5-Monooxygenase Aktivatorprotein zeta bindet an Phosphoserinreste von Proteinen. Es interagiert mit IRS1, ist also vermutlich an der Insulinregulation beteiligt.

2.2.10.6.2 Plattenbelegung

Bei Festlegung der Plattenreihenfolge (vgl. Anhang Tabelle 16 und 17) auf den qRT PCR-Platten mussten einige Aspekte berücksichtigt werden:

- 1) Um Messfehler zu minimieren, wurden von jeder Probe Triplikate verwendet. So konnte man später aus den drei Werten den Mittelwert bilden, bzw. einen stark abweichenden Wert derselben Probe (*Ausreißer*) aussortieren.
- 2) Damit bei der statistischen Auswertung ein Vergleich der Genexpression der Zielgene mit derjenigen der Housekeepinggene möglich war, wurden pro Platte drei *inter run calibratoren* (IRC) verwendet. Dabei handelte es sich um eine humane Lymphoblasten-RNA-Probe, die auf jeder zu messenden Platte als Triplikate mitbestimmt wird.
- 3) Außer der IRC und den Zielgenen, wurde ebenfalls auf jeder Platte eine Positivprobe mit DNA, eine Negativprobe (Wasser) und eine *no template control* (nTC), eingesetzt. Bei der nTC wurde in der vorausgehenden cDNA-Synthese statt RNA als Matrize Wasser eingesetzt. Falls bei dieser Probe in der qRT PCR ein Produkt erkennbar sein sollte, lägen Verunreinigungen vor.
- 4) Da die Platten für die qRT PCR mit einem Roboter pipettiert wurden, musste der Pipettierablauf der Robotersoftware bei der Vorlage der Reagenzien (Mastermix und cDNA-Proben) berücksichtigt werden.
- 5) Die Anordnung der Proben auf der Platte erfolgte nicht nach chronologischer Folge der Entnahmezeitpunkte oder aufsteigender Nummerierung der Proben-codes sondern wurde vorher mit der Zufallszahlfunktion von *Excel* festgelegt (s. Anhang Tabelle 13). So sollte vermieden werden, dass z.B. eine später in der Auswertung festgestellte Expressionserhöhung zu einem Zeitpunkt nicht auf die Platzierung derselben Platte zurückzuführen war.

2.2.10.6.3 QRT PCR-Protokoll

Das verwendete Protokoll (s. Abbildung 8) für die QRT PCR begann mit einer anfänglichen 5-minütigen Denaturierungsphase bei 95 °C (Life Science Group n.d.; Bio-Rad 2009).

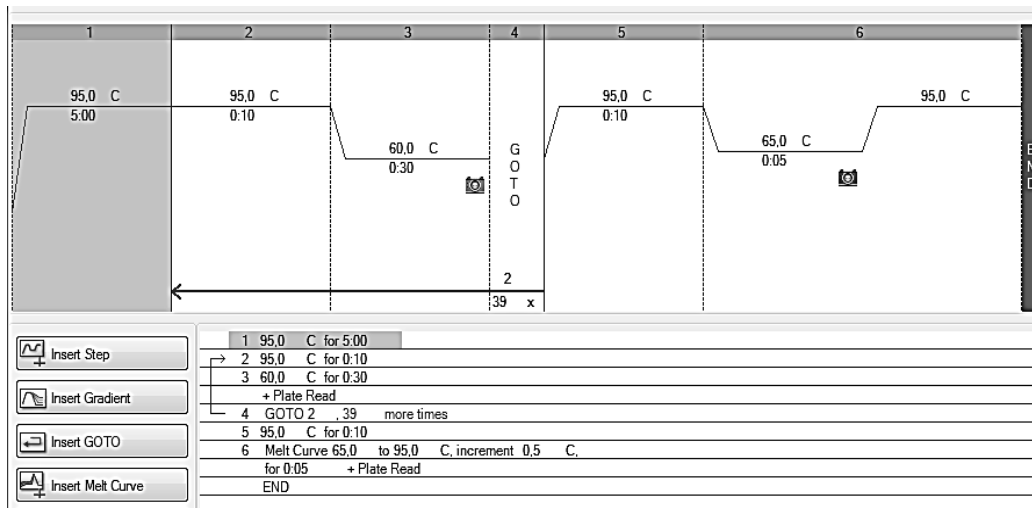


Abbildung 8: Real Time PCR Protokoll

Hier wurde auch die *iTaq*-Polymerase aktiviert, da der Antikörper, der ihre Aktivität hemmt, zerstört wurde. Darauf folgte der eigentliche Amplifikationszyklus bestehend aus Denaturierung, Annealing und Elongation. Dieser wurde 39 Mal wiederholt. Die Denaturierung fand für 10 s bei 95 °C statt und diente der Auftrennung der cDNA-Doppelstränge, weil sich die Polymerase nur an Einzelstränge anlagern kann. Anschließend lagerten sich bei einer 30-sekündigen Annealing-Phase bei 60 °C die Primer dem zu ihrer Sequenz komplementären DNA-Abschnitt an. Die Temperatur wird durch die Länge der Primer bestimmt. Da die verwendeten Primer in der gleichen Größenordnung lagen, wurde die Temperatur nicht verändert. Zu hohe Temperaturen verhindern die Anlagerung, zu niedrige führen zu nicht beabsichtigten Anlagerungen an unspezifische DNA-Sequenzen (Schmitz 2011). Dabei gibt es einen *Forward*-Primer, der sich am 3'-Ende und einen *Reverse*-Primer, der sich am 5'-Ende anlagert. Die Elongationsphase wurde bei 72 °C vollzogen und benötigte ebenfalls 30 s. In dieser Phase bindet die

DNA-Polymerase an die Primer und synthetisiert einen komplementären DNA-Strang aus dNTPs. Dabei ist die Zeit dieser Phase entscheidend: Eine zu kurze Phase ermöglicht keine vollständige Strangsynthese, eine zu lange Phase führt zu fehlerhaften Kopien. Die optimale Länge dieser Phase richtet sich nach der Produktlänge und beträgt ungefähr 0,5-1 min pro 500-1000 bp.

2.2.10.6.3.1 Schmelzkurve

Eine Schmelzkurve beschreibt die Fluoreszenzstärke der Gesamtprobe in Abhängigkeit der Temperatur. Mit ihr kann man Hinweise auf die Art der in der PCR gebildeten Produkte erhalten. Da sich neben dem Zielprodukt auch Primerdimere oder unspezifische Produkte bilden können, die den Amplifikationszyklus beeinflussen und eine genaue Datenauswertung erschweren, war es sinnvoll, eine Schmelzkurve anzufertigen.

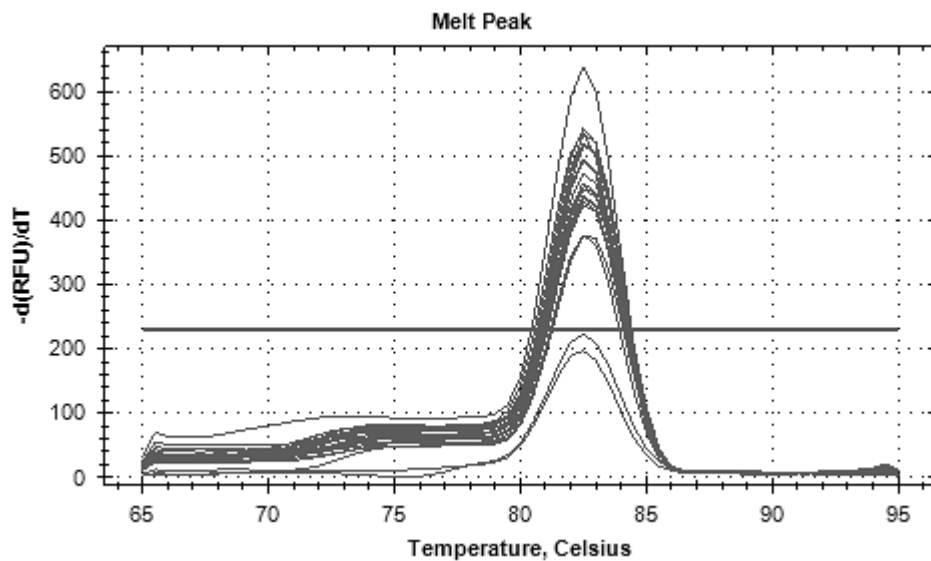


Abbildung 9: Schmelzkurve

Dazu wurde die Temperatur des *iCyclers* 30 s nach den durchlaufenen Amplifikationszyklen in 0,5 °C-Schritten von 55 °C auf 60 °C erhöht, wobei auf jeder Temperaturstufe ein Fluoreszenzsignal registriert wurde. Während des Temperaturanstiegs werden die Nukleinsäuren denaturiert und zerfallen in Einzelstränge. Da das mit Abstand größte Fluoreszenzsignal erreicht wird, wenn *SYBR Green* zwischen die beiden Stränge bindet,

zeichnet sich die Auftrennung der Doppelstränge durch einen deutlichen Signalabfall in der Schmelzkurve ab. Dabei unterscheiden sich die einzelnen Produkte in der Temperatur, bei der die Auftrennung ihrer Stränge beginnt (Schmitz 2011). Stellt man die erste negative Ableitung der Fluoreszenzänderung graphisch dar, erhält man distinkte Maxima, die mit der Schmelztemperatur T_m des jeweiligen Produkts korrespondieren. So kann man nicht nur Primerdimere und unspezifische Produkte detektieren sondern auch die Primerspezifität überprüfen. Primerdimere besitzen aufgrund ihrer geringen Größe meist Schmelztemperaturen, die unter der des gewünschten Produktes liegen. Unspezifische Primeranlagerungen können Produkte mit höheren oder niedrigeren Schmelztemperaturen hervorrufen.

2.2.10.7 Datenverarbeitung und Auswertung

Im ersten Schritt der Auswertung werden die Ergebnisse der quantitativen Real Time PCR aufbereitet. Im Bio-Rad CFX-Manager (Version 3.0) werden Ausreißer-Proben und Proben mit ungültigen Proben aussortiert. Mit der Software LinReg PCR (Version 12.17, 2011). werden Unterschiede, die auf die Position der einzelnen Platten zurückzuführen sind, herausgerechnet. Die anschließenden Berechnungen erfolgen mit der Software IBM SPSS Statistics (Version 19, 2010): Test auf Normalverteilung, Messwiederholungs-ANOVA für multifaktorielles Testen und t-Tests.

2.2.10.7.1 Probenauswahl und -aufbereitung

Vor der Auswertung der Werte wird in der CFX-Datei die Option *Baseline subtracted curve fit* in der Einstellung *Baseline Settings* eingestellt. Danach sortiert man die Tabelle nach *Cq Std. Dev.* Damit sich Messungenauigkeiten oder Fehler und Ungenauigkeiten in vorbereitenden Arbeitsschritten nicht auf die Ergebnisse der Studie auswirken, werden vom Durchschnitt stark abweichende Einzelwerte nachfolgenden Kriterien mit der Funktion *exclude well* aus der Auswertung ausgeschlossen.

- 1) Proben, die keinen zugeordneten Wert enthalten: *unknown without C(t)*
- 2) Triplikate, die eine C(t)- Standardabweichung $>0,5$ und die auch nach Entfernen eines Ausreißers noch eine Spannbreite von $[C(t)_{\max} - C(t)_{\min}] > 0,5$ haben

Alle Proben, bei denen mehr als ein Wert ausgeschlossen wurde, werden wiederholt.

Dann erfolgt die Effizienzbestimmung der Platte bei *LinReg*. Hier werden Messungenauigkeiten gegenüber den anderen PCR-Platten, die alle Proben der Platte betreffen, ermittelt. Zunächst muss man im *CFX-Manager* unter *Settings* die Einstellung *no Baseline Substraction*, dann unter *Quantification Data* die Einstellung *RFU* auswählen. Anschließend wird die Tabelle in *Excel* eingefügt. Die erste (leere) Spalte A wird gelöscht und eine Leerzeile 1 wird eingefügt, in die man *well* im ersten Feld (A1) einträgt. Daraufhin speichert man die Datei und öffnet das Programm *LinReg*. Hier wählt man die Einstellungen *Bio-Rad iCycler, dsDNA*, und gibt die Felder der Exeltabelle an, in denen die Werte gespeichert sind (z.B. column A throuh KC; row 1 through 42). Dann wählt man *Determine Baseline* aus. Das Programm konformiert die Werte. Anschließend nutzt man die Funktion *Save to Excel: compact & complete*. Die Daten erschienen im *output compact* der Exceltabelle. Die Effizienz der Platte sollte >70 sein und keine großen Unterschiede zwischen beiden Platten desselben Primers aufweisen. Nun kann man eine *Gene Study* mit der Software *CFX* anfertigen. Dazu wählt man unter *Gene expression* \rightarrow *Experiment settings* \rightarrow *samples* \rightarrow *targets* aus und wählt für alle Referenzgene den Status *Reference Gen* an. Bei allen Primern trägt man den aus beiden Platten gemittelten Effizienzwert ein und wählt ggf. eine Farbe aus, in der die Statistik dieses Gens später dargestellt werden soll. Anschließend kennzeichnet man unter *Gene expression* \rightarrow *Experiment settings* \rightarrow *samples* alle nRT und nTC-Proben als *control*. Wichtig ist, dass man unter *View/Edit Plate* alle Paramter (bis auf Zielgen) derselben IRC-Proben auf sämtlichen Platten der Versuchsreihe gleich benennt. Nun muss man unter *QC* \rightarrow *exclude well* alle NRT- und NTC-Proben aus der *Gene-Study* ausschließen. Sobald alle QRT PCRs und Wiederholungen der ausgeschlossenen Proben vollendet sind, können die Werte der einzelnen *Run's* in die *Gene Study* geladen werden. Jetzt ermittelt *CFX* die relativen Expressionswerte bezogen auf die Referenzgene.

2.2.10.7.2 Statistische Auswertung

Zunächst wurde die gesamte Stichprobe mit dem **Kologmorov-Smirnoff-Test** auf Normalverteilung getestet. Der ausgegebene Wert beschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass man die Nullhypothese (Die Werte der untersuchten Variablen sind normalverteilt.) fälschlicherweise ablehnt (=Irrtumswahrscheinlichkeit). Je größer der Wert ist, desto eher kann man von einer Normalverteilung ausgehen. Das Vorliegen einer Normalverteilung ist Voraussetzung für die Durchführung von einigen parametrischen Tests. Anschließend wurde der **Mauchly-Test** auf Sphärizität durchgeführt. Sphärizität drückt aus, ob die Varianzen und Kovarianzen der Stichprobenwerte gleich ausfallen und die Stichprobe damit als homogen angesehen werden kann. Fällt der Test positiv aus, kann es sein, dass zu schnell ein signifikantes Ergebnis erreicht wird. Es müsste eine Korrektur der p-value-Grenzen vorgenommen werden.

Die folgende **Messwiederholungs-ANOVA** untersucht, ob die Ergebnisse des Datensatzes bestimmten Gesetzmäßigkeiten folgen. Die Varianz einer oder mehrerer Variablen wird auf Beeinflussung durch einen oder verschiedene Faktoren geprüft. Man kann erkennen, ob die Varianz zwischen den einzelnen Gruppen größer ist als innerhalb der Gruppe und dadurch überprüfen, ob Gruppenunterschiede vorliegen. Hier wurden die Varianz der Gruppen Behandlung (\pm MPH), Gen, Proband (ADHS, Kontrolle) analysiert. Außerdem wurden die Effekte Zeit und Behandlung sowie mehrfaktorielle Effekte aus bereits genannten Parametern ermittelt.

In anschließend durchgeführten **t-Tests** wurden zum einen Gruppenunterschiede zwischen ADHS und Kontrolle (Zweistichprobentest) und Behandlungseffekte durch MPH (Einstichprobentest) durchgeführt. Um kurzfristige Expressionsveränderungen messen zu können, wurden Differenzen aus den Messpunkten t1 und t2 mit dem Messpunkt t0 berechnet, für die Berechnung langfristiger Expressionsveränderungen die Differenzen aus den Messpunkten t3 und t4 mit t0.

Als signifikant wurden p-Werte $p \leq 0,05$ angesehen, als sehr signifikant $p \leq 0,01$ und als Tendenz $p \leq 0,09$.

3 Ergebnisse

3.1 MPH: Pharmakokinetik und Toxizität

Alle Versuche, die sich direkt auf die Eigenschaften von MPH (HWZ) oder seiner Wirkung auf Lymphoblasten (Toxizität, Wachstumsinduktion) beziehen, dienen hauptsächlich der Vorbereitung auf die folgenden Versuchsteile, sollen aber – auf Grund ihrer in wissenschaftlichen Schriften oft aufgeführten Diskussion – im Ergebnisteil präsentiert werden.

3.1.1 MPH Halbwertszeit unter Kulturbedingungen

Die unter den hier gegebenen Kultivierungsbedingungen der Zellkulturen ermittelten Konzentrationen sind in Abbildung 10 dargestellt.

Die einzelnen Messpunkte lassen sich mittels Regression am besten durch die Wachstumskurve der Funktion $f(x) = 108,93 \cdot 0,79^x$ darstellen. Schnittpunkte mit den Geraden

MPH- Halbwertszeitbestimmung

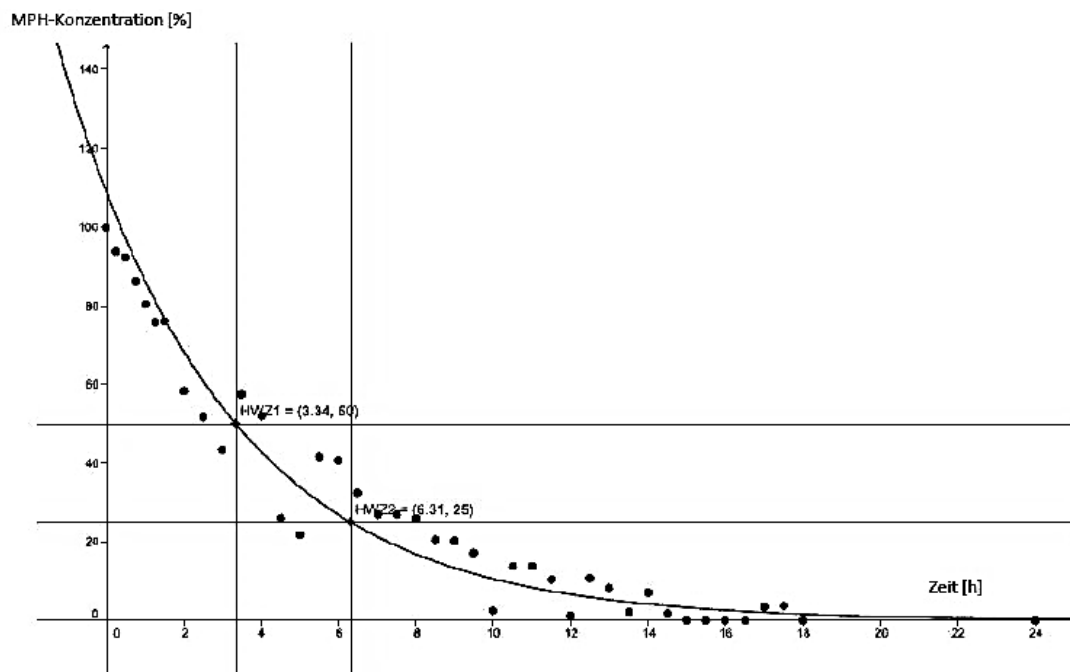


Abbildung 10: MPH-Halbwertszeitbestimmung

$y=50$ und $y=25$ stellen die Punkte dar, an denen noch 50% bzw. 25% der ursprünglichen MPH-Konzentration vorhanden sind. Rechnerisch liegen diese Punkte bei

$$x_{1/2} = \lg(50/1,08) / \lg(0,79) = 3,3$$

$$x_{1/4} = \lg(25/1,08) / \lg(0,79) = 6,24 \rightarrow /2 = 3,12$$

$$x_{1/8} = \lg(12,5/1,08) / \lg(0,79) = 9,18 \rightarrow /3 = 3,06$$

$$x_{1/16} = \lg(6,25/1,08) / \lg(0,79) = 12,125 \rightarrow /4 = 3,03$$

Es ergab sich also eine Halbwertszeit von ca $(3,3 + 3,12 + 3,06 + 3,03)/4 = 3,12$ Stunden. Die ermittelte HWZ entspricht in etwa derjenigen in vivo, die mit 2h angegeben wird, allerdings interindividuell sehr variabel ist und bis zu 7h erreichen kann (Aktories et al. 2009).

3.1.2 MPH Toxizität

Obwohl einige Publikationen toxische Wirkungen von MPH auf dopaminerge Neurone (Allroggen et al. 2010; Ludolph et al. 2006), Erythrozyten (Zamora-Perez et al. 2011), HEK- (Yatin et al. 2002), U-937- und SH-SY5Y-Zellen (Schmidt et al. 2010) in therapeutischer Dosierung widerlegt haben, wurden bei einigen anderen Arbeiten zytotoxische Effekte festgestellt (Carter et al. 2006; Schmidt et al. 2010). Um durch die MPH-Behandlung potentiell hervorgerufene toxische Einflüsse auf das Zellwachstum der lymphoblastoiden Zellkulturen auszuschließen, wurden die Vitalität der Zellen sowie ihr Wachstum unter Stimulation mit verschiedenen MPH-Konzentrationen in einem Vorversuch getestet. Dabei wurden auch Konzentrationen getestet, die deutlich über der geplanten Zielkonzentration der Versuchsreihe lagen.

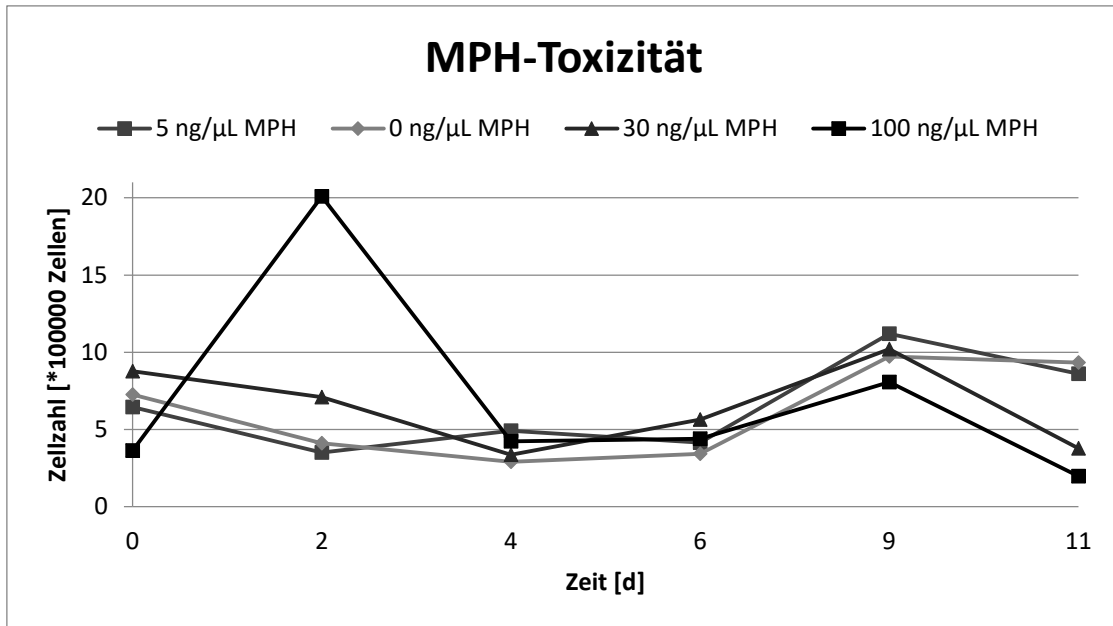


Abbildung 11: MPH-Toxizität

In Abbildung 11 erkennt man die Zellzahl der mit unterschiedlichen MPH-Konzentrationen behandelten Zellkulturen in Abhängigkeit der Zeit. Grundsätzlich ähnelten sich alle Graphen im Verlauf. Der starke Konzentrationsanstieg der 18 ng/μl-Probe zwei Tage nach Inkubationsbeginn stellte einen Ausreißer dar, der sich nicht mehr replizieren ließ. Da die Zellpopulationen bei einer Konzentration von 30 ng/μl gegenüber den Kontrollzellen weder deutliche Wachstumszunahmen noch -abnahmen erkennen ließen, war bei der Versuchsdurchführung unter einer Zielkonzentration von 30 ng/μl nicht mit einem Wachstums beeinflussenden toxischen Effekt von MPH zu rechnen.

3.1.3 Einfluss von MPH auf Zellzahl und -größe

In den folgenden Graphiken sieht man, dass sich die Zellzahlen (s. Abbildung 12) und Zellgrößen (s. Abbildung 13) einer Kultur während eines Inkubationszyklus sowohl mit gewöhnlichem Kulturmedium als auch durch MPH-Behandlung verändert haben. Da sich diese Veränderung zwischen ADHS- und Kontrollzellen unterschied, wurden beide Gruppen auch getrennt voneinander betrachtet. Mit # sind Trends ($p < 0,1$) mit * signi-

Signifikante Effekte ($p \leq 0,05$) gekennzeichnet. Befindet sich das Symbol über dem Messpunkt, bezieht sich der Effekt auf die absoluten Zahlen, steht er über einem Abschnitt des Graphen, bezieht er sich auf die Differenz des folgenden Messpunktes zu Messpunkt t_0 , Differenzen zwischen $t_1 = 26\text{h}$ und t_0 geben Auswirkungen einer einmaligen Inkubation wieder, Messpunkte zwischen $t_2 = 32\text{h}$ und t_0 geben Effekte 6h nach der zweiten MPH-Inkubation wieder. Vor der Messung t_3 wurden die Zellen nicht noch einmal mit MPH behandelt und weisen auf einen längerfristige Effekt hin.

3.1.3.1 Zellzahl

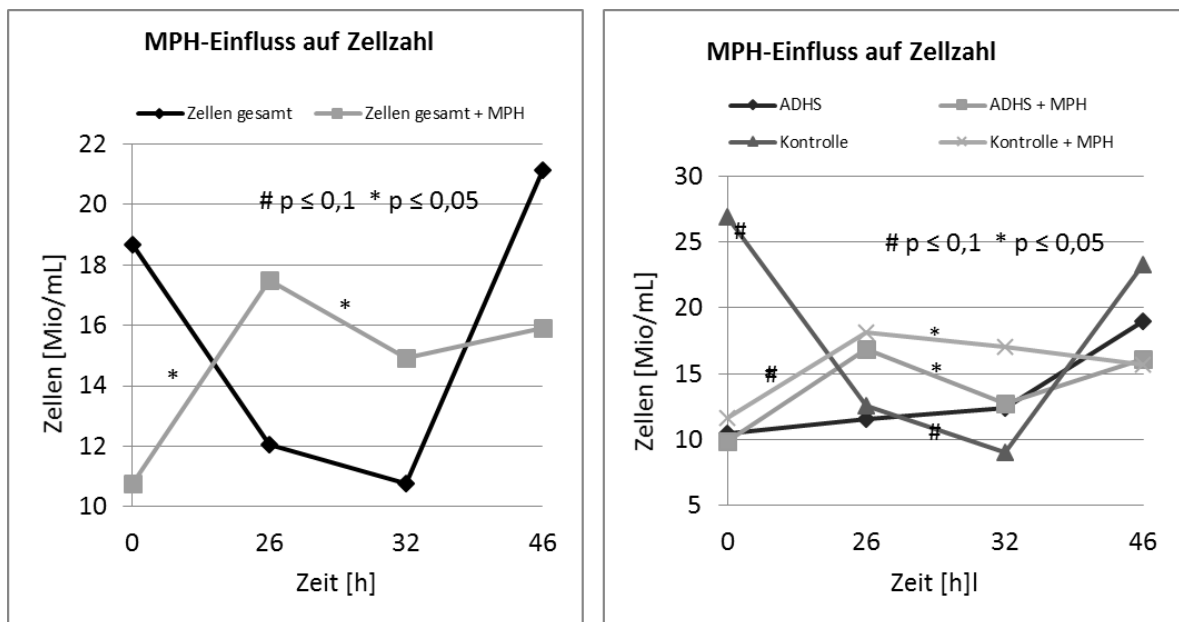


Abbildung 12: MPH-Einfluss auf Zellzahl

Schon zu Beginn dieser Versuchsreihe bestand ein als Tendenz zu beschreibender Unterschied ($p = 0,09$) zwischen ADHS und Kontrollgruppe, wobei die Zellpopulation der ADHS-Zellen geringer konzentriert war. Daraufhin sank die Konzentration der Kontrollzellen innerhalb von 32 h ab ($p = 0,06$), während sie bei den ADHS-Zellen anstieg. Bis zum Messzeitpunkt nach 46 h stieg die Zellkonzentration in beiden Gruppen.

In Abbildung 12 links sieht man, dass MPH in 26 h das Zellwachstum signifikant steigerte ($p = 0,036$), während es nach 32 h (t_2) zu einer signifikanten Hemmung ($p = 0,045$)

fürte. Da die MPH-Behandlung verschiedene Effekte auf ADHS- und Kontrollgruppe zu haben schien, werden beide Gruppen im Folgenden getrennt betrachtet. Abbildung 12 rechts stellt den Interaktionseffekt von MPH auf die ADHS-Gruppe (blaue Graphen) dar. Da die Zellkonzentration auch ohne MPH-Behandlung kontinuierlich zunahm, konnte man diesen Effekt nicht der MPH-Behandlung zuordnen. Bei den gesunden Kontrollen kam es unter Inkubation mit normalem Kulturmedium zu einem Abfall der Zellkonzentration zum Zeitpunkt $t_1 = 26$ h ($p = 0,086$) und $t_2 = 32$ h ($p = 0,048$).

3.1.3.2 Zellgröße

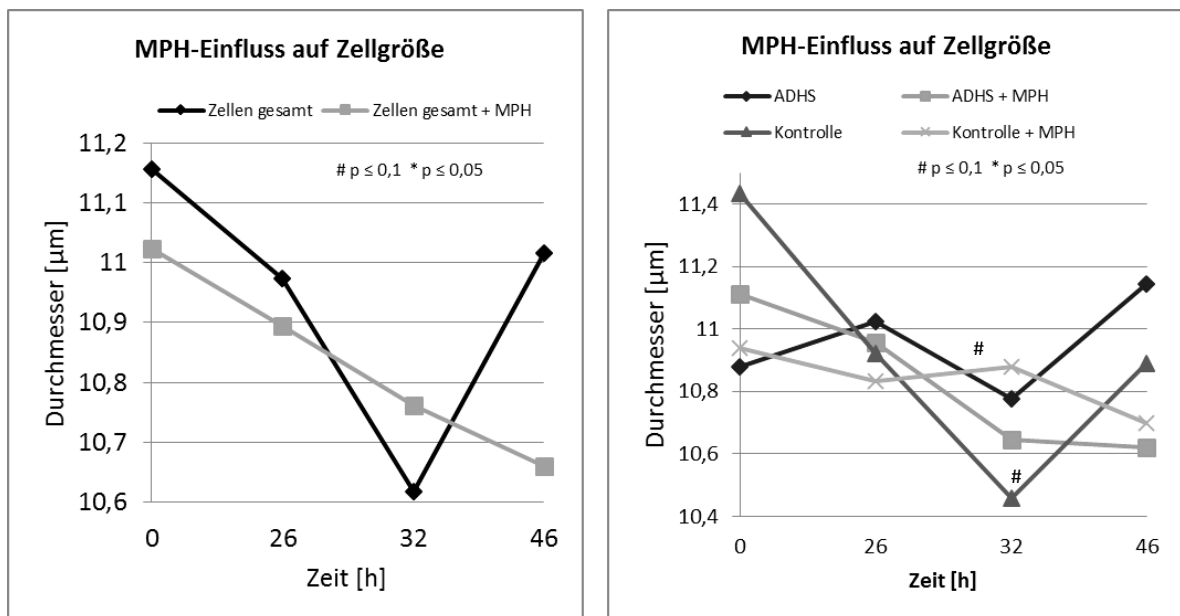


Abbildung 13: MPH-Einfluss auf Zellgröße

Auch wenn sich die Zellgröße zwischen ADHS- und Kontrollzellen zu Beginn des Versuchs nicht signifikant unterschied, führte die Kultivierung zu einem tendenziellen ($p = 0,076$ nach 32 h) Unterschied. Während die Zellgröße bei ADHS zunächst den gesamten Beobachtungszeitraum mit einem Zelldurchmesser von durchschnittlich etwa $11 \mu\text{m}$ konstant blieb bzw. nur kleinen Schwankungen unterlag, nahm sie bei Kontrollzellen während der Kultivierung von $11,2 \mu\text{m}$ auf $10,4 \mu\text{m}$ ab, was eine Abnahme von mehr als 7 % bedeutete. Anschließend stieg die Zellgröße der Kontrollgruppe wieder an, erreichte aber nicht die Ausgangsgröße.

In Abbildung 13 links wurden die Messwerte der ADHS- und Kontrollgruppe zu einem Graphen zusammengefasst, um einen generellen Behandlungseffekt zu ermitteln. Auch wenn die Graphen nicht vollständig parallel verliefen, zeichneten sich keine signifikanten Unterschiede in der Zellgröße zwischen behandelten und unbehandelten Zellen ab. Betrachtete man den Behandlungseffekt der beiden Gruppen allerdings im Vergleich (s. Abbildung 13 rechts), zeigte sich bei der ADHS-Gruppe eine signifikant stärkere Größenabnahme nach 32 h ($p = 0,042$).

Im Folgenden wurde der Behandlungseffekt nur innerhalb einer Gruppe getrennt betrachtet. Ohne MPH übertrafen die ADHS-Zellen (Abbildung 13 rechts) nach einer anfänglichen Größenabnahme wieder ihre Ausgangsgröße von ca. $11 \mu\text{m}$, während sie unter Behandlung mit MPH um 4.5 % abnahmen. Im Gegensatz dazu verursachte die MPH-Behandlung bei den Kontrollzellen (s. Abbildung 13 rechts) in den ersten 32 nach Inkubationsbeginn eine verminderte Größenzunahme ($p = 0,09$). Langfristig waren die Zellen allerdings mit und ohne Behandlung kleiner als beim Ausgangswert t_0 .

3.2 Genexpressionsanalyse

Für eine aussagekräftige Genexpressionsanalyse war die Qualität der untersuchten Proben entscheidend. In Tabelle 11 (s. Anhang) sind die Konzentrationen, 260/280-, 260/230-, 28S/18S- und RQI- und RIN-Werte aller Proben, die mit den Verfahren NanoDrop und Experion ermittelt wurden, aufgeführt. In beiden Messverfahren hatten die Proben eine durchschnittliche RNA-Konzentration von $354 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 187$. Die 260/280 Werte lagen über dem Zielwert von 1,8. Diese beiden Messergebnisse stellten also optimale Voraussetzungen für die weiteren Versuche dar. Etwas schlechter fielen mit einem Durchschnittswert von $1,48 \pm 0,44$ die 260/230 Werte aus. Bei einigen Proben musste man also von einer leichten Verunreinigung ausgehen. Die Werte 28S/18S ($1,39 \pm 0,72$), RQI ($9,94 \pm 0,08$) und RNI ($9,62 \pm 0,13$) ließen auf eine gute RNA-Qualität zurückschließen.

3.2.1 Microarray

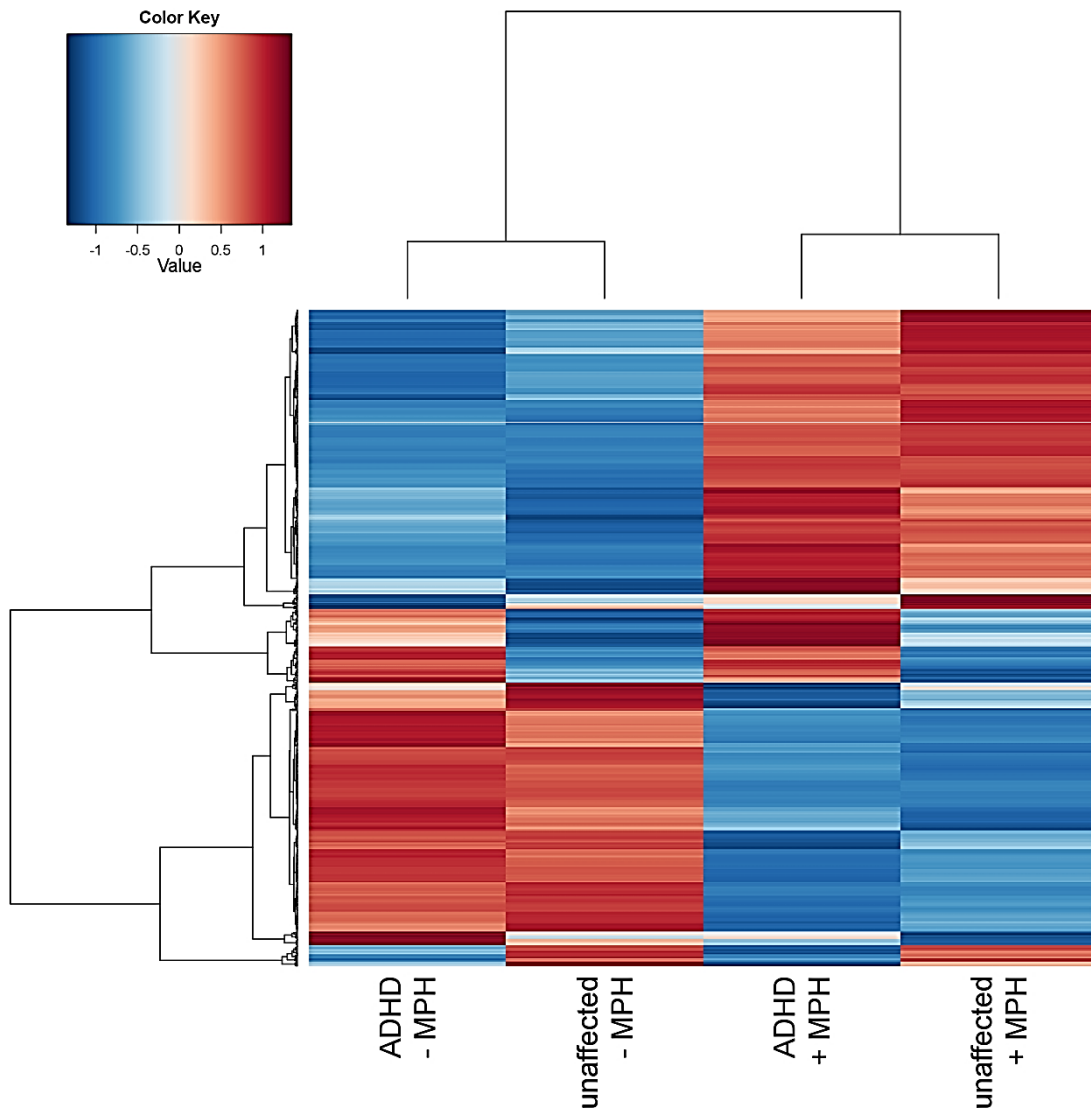


Abbildung 14: Microarray Heatmap

In einem Modell für gepaarte Daten und einer False-Discovery-Rate (FDR) von $< 0,05$ ergeben sich global keine signifikanten Veränderungen durch die MPH-Behandlung. Erhöhte man die FDR jedoch minimal ($0,05 < \text{FDR} < 0,06$ bzw. FDR-Korrektur auf $0,0574$) zeigten 163 Gene signifikante Unterschiede ($p < 0,00139$). Aus diesen Genen wurden die 138 besten ausgewählt. Weitere Genexpressionsunterschiede erreichten Trendniveau. Unter diesen Genen waren einige in der Literatur bereits mit ADHS und anderen psychiatrischen Erkrankungen bzw. der Behandlung mit MPH oder anderen Stimulanzi-

en in Zusammenhang gebracht. Die Genexpression von *HEY1*, *SLC2A3*, *ATXN1*, *GUCY1B3*, *MAP3K8* und *NAV2* sollten daher zu allen Versuchszeitpunkten mittels qRT-PCR genauer untersucht werden.

Tabelle 9: Microarray-Daten

Genname	Rang	Affy ID	log fold change	Durchschnittliche Expression	t-Wert	p-Wert	false discovery rate	log odds
<i>HEY1</i>	8	44783_s_at	0,98	10,06	18,40	1,18E-05	0,06	3,64
<i>HEY1</i>	16	218839_at	0,85	9,27	16,29	2,10E-05	0,06	3,28
<i>SLC2A3</i>	18	202499_s_at	0,99	11,01	16,04	2,26E-05	0,06	3,23
<i>ATXN1</i>	23	1559249_at	-0,81	7,64	-15,50	2,66E-05	0,06	3,12
<i>GUCY1B3</i>	27	203817_at	0,88	9,51	15,06	3,05E-05	0,06	3,03
<i>SLC2A3</i>	31	202498_s_at	0,78	9,58	14,42	3,74E-05	0,06	2,89
<i>SLC2A3</i>	124	202497_x_at	0,58	10,26	10,98	0,000134763	0,06	1,87
<i>MAP3K8</i>	128	205027_s_at	0,69	10,26	10,92	0,000138733	0,06	1,84
<i>NAV2</i>	581	218330_s_at	0,47	7,58	7,44	0,000803435	0,08	0,20

Je nachdem ob es sich um eine Über- oder Unterexpression handelte, wurden im Rohdatensatz Expressionsveränderungen um denselben Faktor (z. B. 2) verschiedenen Wertbeträgen zugeordnet. Damit die Daten symmetrisch zum Ausgangswert eines Gens dargestellt werden konnten, wurde der *log fold change* verwendet (Dreischer). Die *False discovery Rate* (FDR) ist eine statistische Methode um falsch positive Befunde bei multiplem Testen auszuschließen bzw. die Rate an falsch-positiven Befunden zu reduzieren.

3.2.2 Quantitative Real Time PCR

In der folgenden Tabelle sind die relativen Genexpressionswerte der Gene *ATXN1*, *GLUT3*, *GUCY1B3*, *HEY1*, *MAP3K8* und *NAV2* differenziert nach Gruppe (ADHS bzw. Kon-

trolle) und Behandlung (MPH bzw. Vehikel) zu den verschiedenen Messzeitpunkten t_0 , t_1 , t_2 , t_3 und t_4 mit ihrer Standardabweichung dargestellt.

Tabelle 10: Real Time PCR Daten

Gen	Probe	Behandlung	t_0	t_1	t_2	t_3	t_4
ATXN1	Kontrolle		0,91 ± 0,73	1,64 ± 0,39	1,11 ± 0,61	1,36 ± 0,77	1,16 ± 0,92
		MPH	1,20 ± 0,90	1,45 ± 0,84	1,12 ± 0,71	2,19 ± 0,77	1,11 ± 0,96
	ADHS		1,47 ± 0,70	1,16 ± 0,61	1,22 ± 0,60	1,60 ± 0,97	1,70 ± 1,14
		MPH	1,50 ± 0,68	2,12 ± 0,74	1,60 ± 0,46	1,55 ± 1,03	1,81 ± 0,35
GLUT3	Kontrolle		0,88 ± 0,31	1,07 ± 0,50	0,44 ± 0,19	0,82 ± 0,27	0,96 ± 0,24
		MPH	0,69 ± 0,25	1,02 ± 0,38	0,60 ± 0,40	0,84 ± 0,48	1,48 ± 0,69
	ADHS		0,55 ± 0,28	0,70 ± 0,20	0,35 ± 0,13	0,78 ± 0,25	0,84 ± 0,44
		MPH	0,66 ± 0,19	1,19 ± 0,73	0,41 ± 0,16	0,82 ± 0,23	0,89 ± 0,30
GUCY1B3	Kontrolle		0,21 ± 0,31	0,37 ± 0,47	0,21 ± 0,24	0,40 ± 0,49	0,53 ± 0,61
		MPH	0,19 ± 0,22	0,36 ± 0,47	0,30 ± 0,40	0,42 ± 0,54	0,55 ± 0,70
	ADHS		0,39 ± 0,36	0,41 ± 0,34	0,40 ± 0,36	0,64 ± 0,66	1,01 ± 0,95
		MPH	0,50 ± 0,37	0,50 ± 0,45	0,39 ± 0,33	0,61 ± 0,57	0,87 ± 0,82
HEY1	Kontrolle		0,47 ± 0,24	0,71 ± 0,45	0,45 ± 0,25	0,53 ± 0,45	1,18 ± 0,82
		MPH	0,54 ± 0,30	0,80 ± 0,58	0,63 ± 0,42	0,85 ± 0,58	0,97 ± 0,52
	ADHS		0,52 ± 0,24	0,89 ± 0,44	0,74 ± 0,40	1,15 ± 0,52	1,17 ± 0,59
		MPH	0,59 ± 0,26	0,80 ± 0,41	0,68 ± 0,30	1,11 ± 0,54	1,23 ± 0,89
MAP3K8	Kontrolle		1,48 ± 0,22	2,39 ± 0,72	1,75 ± 0,50	1,76 ± 0,45	2,16 ± 0,35
		MPH	1,60 ± 0,23	2,27 ± 0,67	1,70 ± 0,38	1,94 ± 0,50	2,74 ± 0,43
	ADHS		1,38 ± 0,50	2,41 ± 0,53	1,57 ± 0,58	1,74 ± 0,40	2,10 ± 0,82
		MPH	1,54 ± 0,39	2,12 ± 0,66	1,55 ± 0,37	1,82 ± 0,35	2,29 ± 0,67
NAV2	Kontrolle		0,49 ± 0,21	0,51 ± 0,21	0,34 ± 0,18	0,94 ± 0,33	0,98 ± 0,40
		MPH	0,56 ± 0,27	0,60 ± 0,26	0,28 ± 0,13	1,17 ± 0,61	0,94 ± 0,47
	ADHS		0,52 ± 0,20	0,44 ± 0,17	0,33 ± 0,21	1,02 ± 0,45	1,28 ± 0,56
		MPH	0,62 ± 0,41	0,62 ± 0,18	0,38 ± 0,18	0,95 ± 0,54	1,28 ± 0,68

Die Messwiederholungs-ANOVA ergab signifikante Haupteffekte für *Gen* und *Zeit* und signifikante Interaktionseffekte für *Behandlung*Zeit*Diagnose* (ATXN1 $p < 0,001$, $p = 0,046$; GLUT3 $p < 0,001$, $p = 0,019$), aber keine Haupteffekte für *Diagnose* im Sinne eines grundsätzlichen Genexpressionsunterschieds zwischen ADHS- und Kontrollprobanden.

3.2.2.1 Gruppeneffekte

Im Diagramm (Abbildung 15) sind Mittelwert und Standardabweichung der Genexpression dargestellt. Dabei repräsentiert der erste Balken jedes Gens die Gruppe der ADHS-Patienten, der zweite die der Kontrollprobanden. Die Unterschiede zum Zeitpunkt t0 erreichten keine statistische Signifikanz. Lediglich bei *GUCY1B3* konnte in der ADHS-Gruppe eine signifikant höhere Expression zum Zeitpunkten t0 ($p = 0,002$) ermittelt werden.

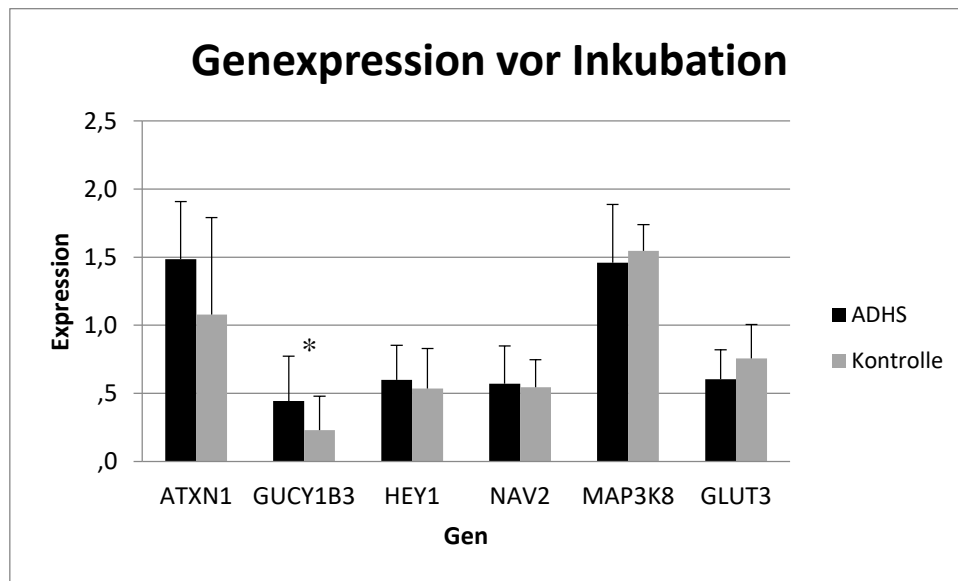


Abbildung 15: Genexpression vor MPH-Inkubation

3.2.2.2 Interaktionseffekte

Im Folgenden wurden zwei unterschiedliche Berechnungsansätze verwendet, um den Behandlungseffekt mit MPH zu ermitteln: Zum einen wurden die absoluten Genexpressionslevel zu jedem Zeitpunkt verglichen. Zum anderen wurden die Genexpressionsdifferenzen jedes Zeitpunktes zum Zeitpunkt t0 (tx-to) verglichen. Letzteres soll die zeitliche Dynamik durch die Methylphenidatbehandlung erfassen.

Da bei keinem der Gene außer *GUCY1B3* ein signifikanter Unterschied zwischen ADHS- und Kontrollgruppe zum Zeitpunkt t0 vorlag, wurden die Gruppen zur Beschreibung der Genexpressionsveränderungen durch MPH (Differenzen zu t0) zunächst zusammengefasst. In Abbildung 16 sind die Expressionsunterschiede zwischen MPH-behandelten

und unbehandelten Zellkulturen mit dem höchsten Signifikanzniveau dargestellt:
ATXN1 t1: $p = 0,0175$; *MAP3K8* t1: $p = 0,072$; *HEY1* t3: $p = 0,112$; *GLUT3* t4: $p = 0,147$.

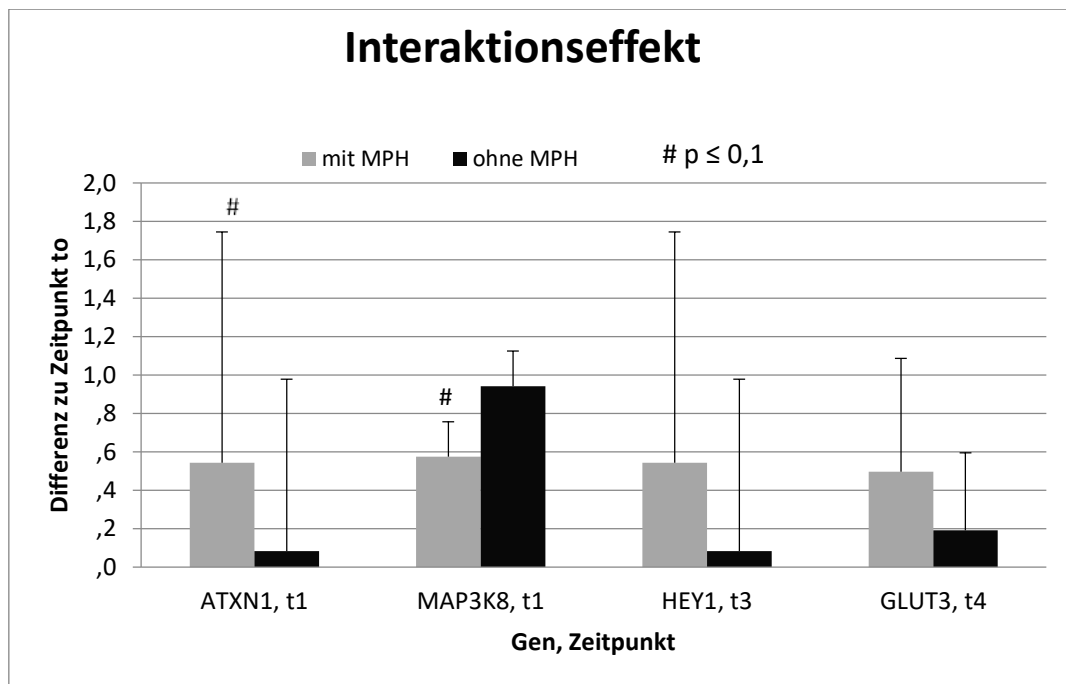


Abbildung 16: Genexpressionswerte zu verschiedenen Zeitpunkten ohne Unterteilung in ADHS-/Kontrollgruppe

Die Balken repräsentieren Differenzen des jeweiligen Messzeitpunktes zum Zeitpunkt t0. Es kam also in allen dargestellten Fällen – unabhängig von der Behandlung – zu einer Expressionssteigerung (Alle Balken befinden sich im positiven Bereich.). Diese wurde durch MPH-Behandlung allerdings moduliert. Interessanterweise wurde bei *MAP3K8* der Expressionsanstieg unter Einfluss von MPH tendenziell gehemmt ($p=0,072$), während es bei *ATXN1*, *HEY1* und *GLUT3* den Anstieg steigerte. Die Veränderungen wurden in kurz- (t1) und langfristige (t3, t4) unterteilt.

Obwohl nur bei *GUCY1B3* ein signifikanter Gruppenunterschied zwischen ADHS und Kontrolle zum Zeitpunkt t0 detektiert werden konnte, zeigten sich bei den anderen Genen signifikante Unterschiede im Behandlungseffekt. Deswegen erfolgte nun eine nach Gruppen getrennte Beschreibung der Ergebnisse.

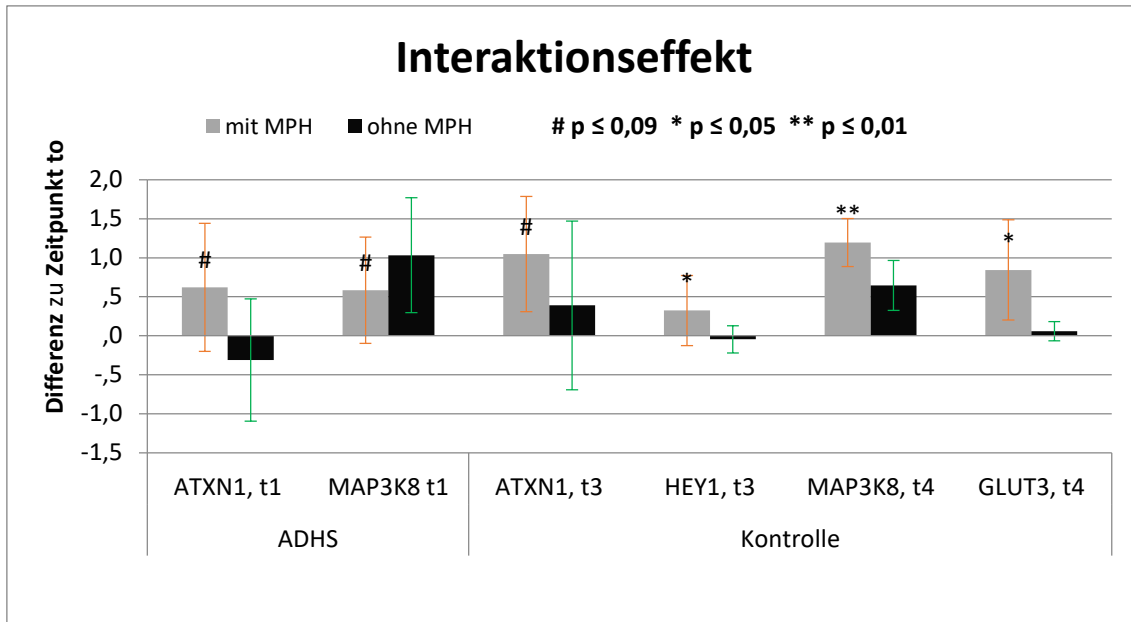


Abbildung 17: Interaktionseffekt Gruppen

Deutliche Unterschiede ($p < 0,09$) durch MPH-Behandlung wurden in Abbildung 17 dargestellt. Bei den hier dargestellten Differenzen (jeweils zu t_0) konnte man erkennen, dass durch die MPH-Behandlung bis auf *MAP3K8* t_1 bei der ADHS-Gruppe in allen Fällen ein erhöhter (bzw. bei *ATXN1*, t_1 , ADHS überhaupt ein) Expressionsanstieg vorlag, welcher allerdings unterschiedlich stark ausfiel. In der ADHS-Gruppe konnte nur bei *ATXN1* ($p = 0,057$) und *MAP3K8* ($p = 0,09$) ein Trend in der Expressionsveränderung beschrieben werden. Interessanterweise war dies in beiden Fällen ein Kurzeiteffekt (t_1). In der Kontrollgruppe hingegen konnten nur die langfristigen Genexpressionsveränderungen (t_3 , t_4) durch MPH-Medikation tendenzielle und signifikante Unterschiede erzielen. Dazu zählen *ATXN1* ($p = 0,056$), *MAP3K8* ($p = 0,005$), *HEY1* ($p = 0,042$) und *GLUT3* ($p = 0,033$).

3.2.3 Auswertung der einzelnen Gene

Nachfolgend wird die Expression der einzelnen Gene differenziert nach Gruppe (ADHS – dreieckig vs. Kontrolle – quadratisch) und Behandlung (MPH – hell vs. Vehikel – dun-

kel) dargestellt. Befindet sich die Signifikanzmarkierung über einem Zeitpunkt, handelt es sich um den absoluten Genespressionsvergleich. Ist dagegen eine Verbindungslinie zwischen zwei Zeitpunkten, ist die zeitliche Dynamik durch MPH gemeint. Man kann bei fast allen Analysen eine deutliche Expressionssteigerung zum Zeitpunkt t1 in Bezug zu t0 feststellen, der zum Zeitpunkt t2 (fast) vollständig ausgeglichen ist. Zum Zeitpunkt t3 steigen die Graphen wieder an, wobei die Werte von t2 entweder unterschritten (*GLUT3*, *MAP3K8*), wieder erreicht (*ATXN1*, *GUCY1B3*) oder sogar überschritten (*HEY1*, *NAV2*) werden. Zum Zeitpunkt t4 ist die Genexpression bei allen Gruppen (außer *ATXN1*, Kontrolle unter MPH-Behandlung) gegenüber dem Ausgangswert bei t0 erhöht.

3.2.3.1 *ATXN1*

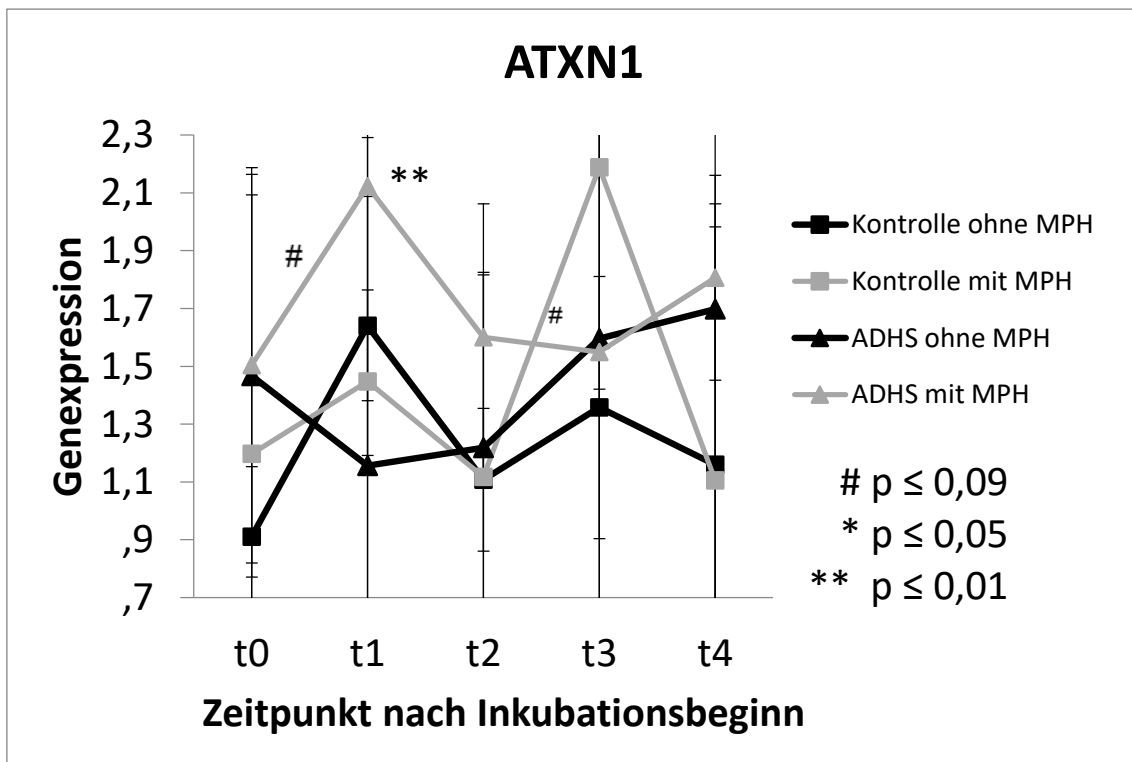


Abbildung 18: *ATXN1*, Expressionsverlauf

Insgesamt lässt sich durch MPH eine Genexpressionserhöhung feststellen, die sich bei ADHS-Probanden vor allem im Kurzeffekt t1 und nach einer Woche (Vergleich absoluter Werte t1 $p = 0,008$ und der Differenzen t1 $p = 0,056$; t3 $p = 0,056$) auswirkt (Abb. 18).

3.2.3.2 GLUT3

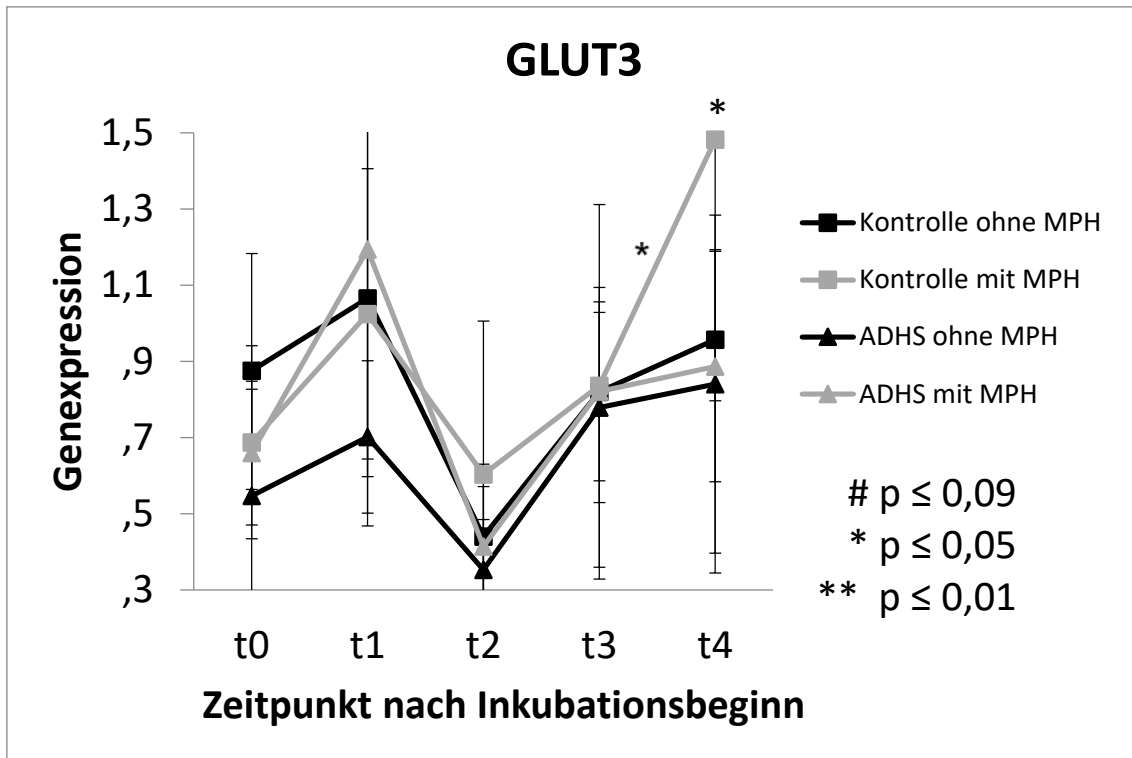


Abbildung 19: GLUT3, Expressionsverlauf

Die GLUT3-Genexpression fällt in der Kontrollgruppe zu fast allen Zeitpunkten höher aus als in der ADHS-Gruppe (Abb. 19). In beiden Gruppen wurde sie durch MPH-Behandlung erhöht, was in der Kontroll-Gruppe sogar einen signifikanten Unterschied zum Zeitpunkt t4 sowohl bei den absoluten Werten ($p = 0,044$) als auch im Differenzenvergleich ($p = 0,033$) ergibt.

3.2.3.3 GUCY1B3

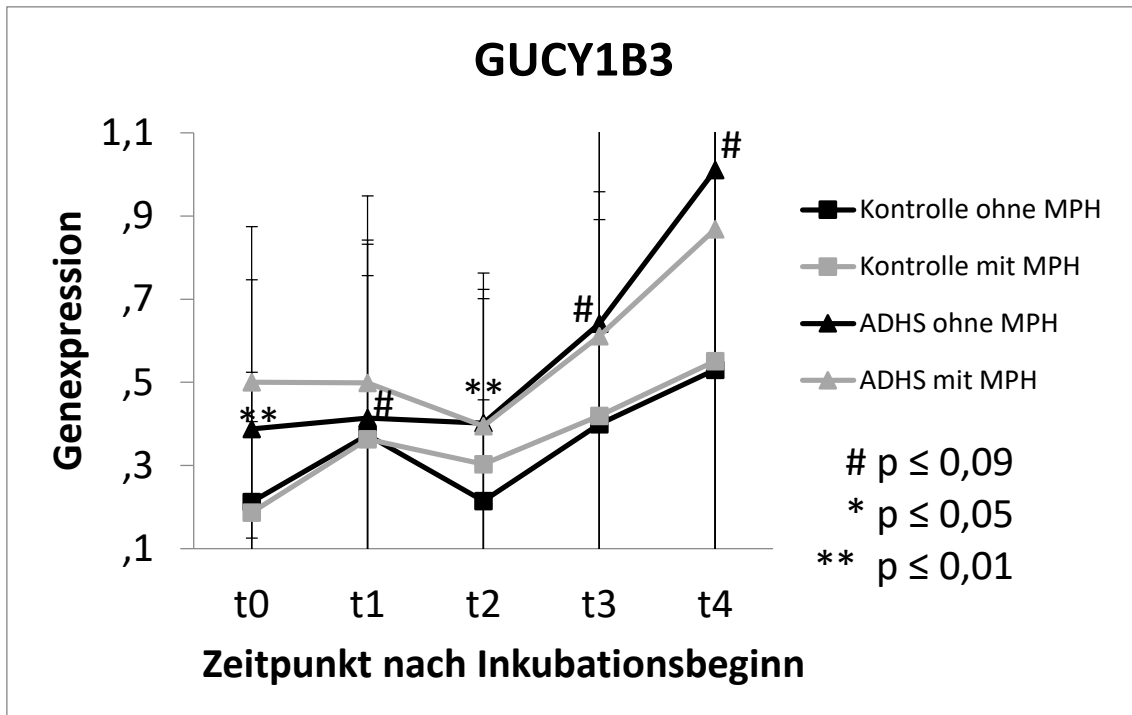


Abbildung 20: GUCY1B3, Expressionsverlauf

MPH hatte weder bei ADHS- noch bei Kontrollzellen einen signifikanten Einfluss auf die Expression der Guanylatcyclase 1B3 (Abb. 20). Zu beachten ist allerdings ein Gruppenunterschied zwischen ADHS und Kontrollen: Zu allen Messzeitpunkten war *GUCY1B3* bei ADHS stärker exprimiert. Dieser Unterschied ist zum Zeitpunkt t0 und t2 sehr signifikant ($p = 0,002$, $p = 0,027$), zu den Zeitpunkten t1, t3 und t4 lässt sich ein Trend beschreiben ($P = 0,089$, $p = 0,055$, $p = 0,064$).

3.2.3.4 HEY1

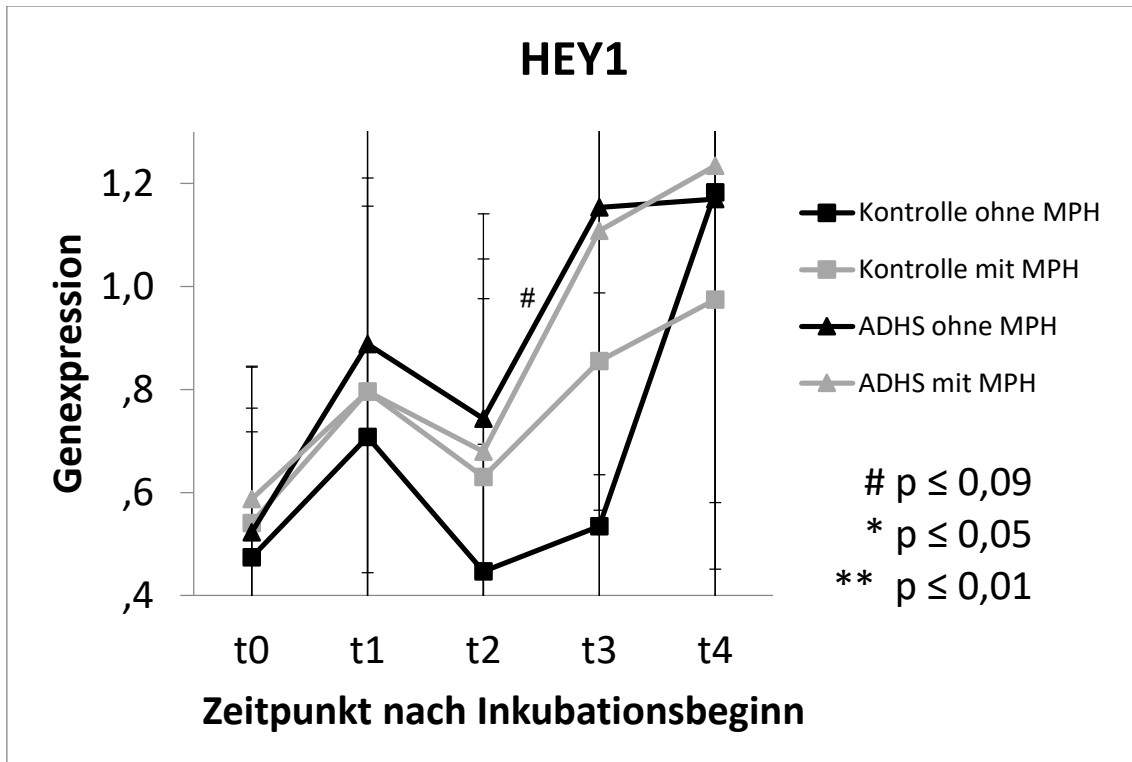


Abbildung 21: HEY1, Expressionsverlauf

Unter der MPH-Behandlung werden die Expressionswerte von *HEY1* zu den Zeitpunkten t1, t2 und t3 der ADHS- und Kontrollgruppe aneinander angenähert (Abb. 21). Der Behandlungseffekt durch MPH ist in der ADHS-Gruppe zum Zeitpunkt t3 signifikant ($p=0,042$): MPH führt zu einer geringeren Genexpression.

3.2.3.5 MAP3K8

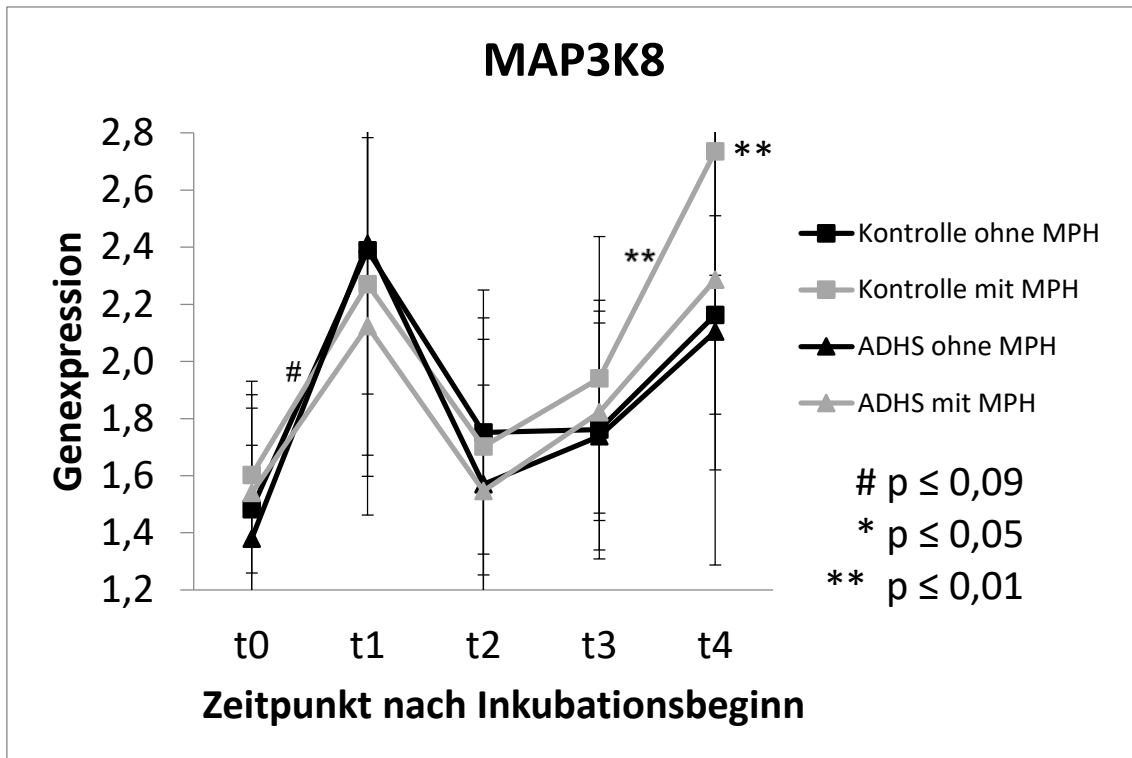


Abbildung 22: MAP3K8, Expressionsverlauf

Beim Kandidatengen *MAP3K8* verliefen alle Graphen sehr ähnlich. In der Kontrollgruppe wurde zum Zeitpunkt t4 ein statistisch hoch signifikanter Unterschied erreicht: Unter MPH wurde die Expression hoch signifikant ($p = 0,005$) gesteigert (Abb. 22). Der Differenzenvergleich zeigte einen tendenziellen Behandlungseffekt zum Zeitpunkt t1 in der ADHS-Gruppe ($p = 0,09$) und einen hoch signifikanten Behandlungseffekt in der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt t4 ($p = 0,005$).

3.2.3.6 NAV2

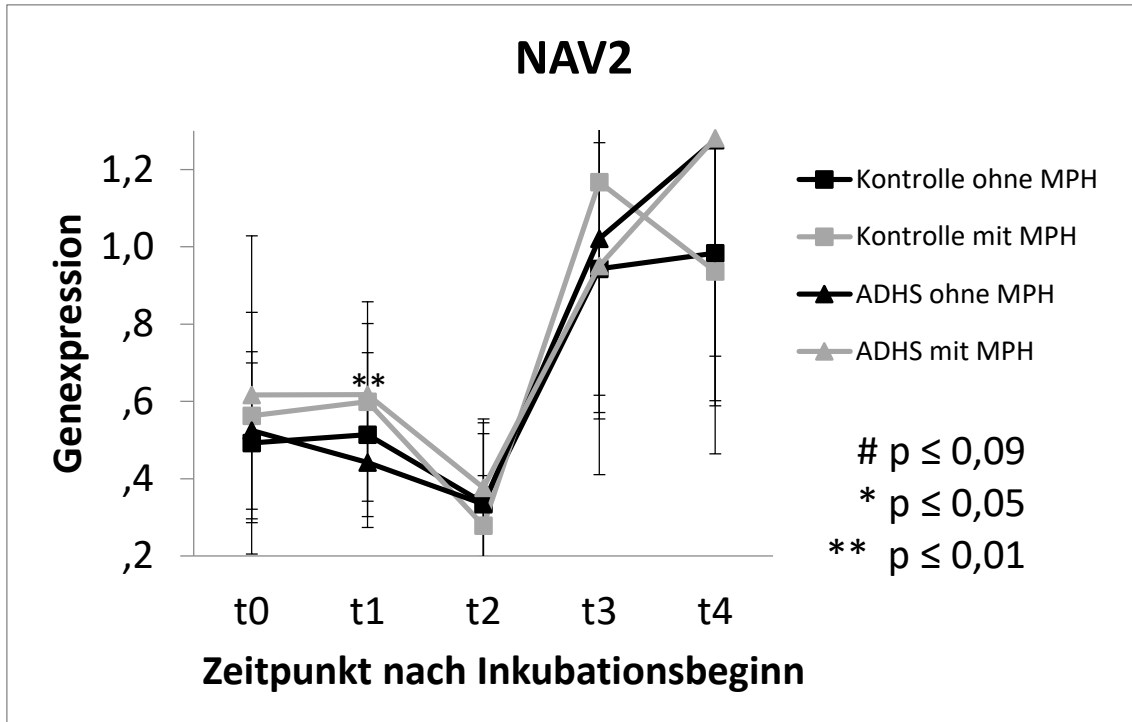


Abbildung 23: NAV2, Expressionsverlauf

Die Genexpression des Neuronen Navigator 2 (NAV2) zeigt bei allen Gruppen einen ähnlichen Verlauf. Lediglich zum Zeitpunkt t1 unterscheiden sich die Genexpression der ADHS-Gruppe unter MPH-Behandlung hoch signifikant ($p = 0,001$) von der Kontrollgruppe (Abb. 23).

Zusammenfassend zeigt die MPH-Behandlung also eine signifikante kurzfristige (t1) Expressionssteigerung in der ADHS-Gruppe bei NAV2 und ATXN1 und eine signifikante langfristige (t4) Expressionssteigerung in der Kontrollgruppe bei GLUT3 und MAP3K8. Eine signifikante Genexpressionsveränderung im zeitlichen Verlauf (Differenzenvergleich) ergab sich in der ADHS-Gruppe sowohl kurzfristig bei ATXN1 und MAP3K8 als auch zum Zeitpunkt t3 bei ATXN1 und HEY1 und in der Kontrollgruppe langfristig bei MAP3K8 und SLC23. Die MPH-Behandlung führte fast ausschließlich zu einer Steigerung der Genexpression. Lediglich bei MAP3K8 kam es zu einer kurzfristigen Reduktion

der Genexpression in der ADHS-Gruppe. Ein Gruppenunterschied zwischen ADHS Patienten und gesunden Kontrollen konnte nur bei *GUCY1B3* ermittelt werden, dessen Expression in der ADHS Gruppe zu allen Zeitpunkten marginal bis hoch signifikant höher war.

4 Diskussion

In dieser Studie sollte mit einem peripheren Zellkulturmodell untersucht werden, ob sich die Genexpression in Lymphozyten zwischen ADHS- und Kontrollprobanden unterscheidet und durch eine Behandlung mit MPH kurz- oder langfristig verändert wird. Die Analyse mittels Microarray zeigte zahlreiche unterschiedlich regulierte Gene. Auch mit der qRT PCR konnten Genexpressionsunterschiede durch die Behandlung mit MPH nachgewiesen werden. Warum die Ergebnisse dieser beiden Verfahren nicht komplett übereinstimmen, kann daran liegen, dass für den Microarray die Proben zum Zeitpunkt t0 und t4 gepoolt wurden. In der qRT PCR hingegen wurden die Proben einzeln und auch zu den weiteren Zeitpunkten t1, t2 und t3 untersucht. Aus diesem Grund wurden verschiedene Auswertungsverfahren verwendet, die unterschiedliche statistische Ergebnisse hervorrufen können.

In der zuerst durchgeführten Microarray-Untersuchung ergaben einige Genexpressionswerte Unterschiede, die nach einer Korrektur für multiples Testen den statistischen Schwellenwert nur knapp unterschritten. Aus diesen wurden Gene ausgewählt, die in der Literatur mit ADHS, Methylphenidat oder auch mit hierfür relevanten Signalwegen in Verbindung gebracht wurden. Im Folgenden wird diskutiert, in wieweit sich unsere Befunde mit Erkenntnissen aus anderen Studien vereinbaren lassen oder diesen widersprechen.

4.1 ATXN1

Ataxin 1 (*ATXN1*) wird vor allem mit der Erkrankung Spinocerebelläre Ataxie (SCA) in Zusammenhang gebracht, bei der in diesem Gen ein Defekt vorliegt. Allerdings wird eine Genveränderung bzw. ein Funktionsverlust des Genprodukts auch bei der Pathogenese von ADHS, Autismus Spektrum Störungen (ASD) und Alzheimer-Demenz (AD) diskutiert (Celestino-Soper et al. 2012; Franke, Neale, and Faraone 2009; Zhang et al. 2010). *ATXN1* wird in Basalganglien, Pons und Cortex und in Purkinje-Zellen des Kleinhirns exprimiert (Rizzi et al. 2011). Die höchste Expression zeigt es in Neuronen des Gyrus dentatus und in hippocampalen Pyramidenzellen (Matilla et al. 1998). Eine Überexpression von *ATXN1* mit erweiterter Polyglutaminregion in transgenen Mäusen soll den Transport von Membranproteinen beeinflussen (Zhang et al. 2010). Ataxin agiert in Notch-Signalwegen und als transkriptioneller Repressor von Capicua Homolog CIG, LANP, Retinoid- und Tyroidrezeptoren (SMRTER), Histondeacetylasen 3 und 4 (HDAC3, 4), GFI-1 und ROR α (Crespo-Barreto et al. 2010; Barøy et al. 2013). Außerdem ist *ATXN1* ein Targetgen des D2-Signalweges: Wird der D2-Rezeptor aktiviert, inhibiert eine G-Protein-gekoppelte Kinase die Adenylatcyklase und verhindert so die cAMP-Bildung, die notwendig ist, damit die PKA den einzelnen Serinrest S776 von Ataxin phosphoryliert. Dieser Signalweg wird bei transgenen Mäusen mit *ATXN1*-Verlust herunterreguliert, bei ADHS-Erkrankten erscheint er im PET in Gehirnbereichen des Belohnungssystems jedoch gesteigert (Hearst et al. 2010; Volkow et al. 2009).

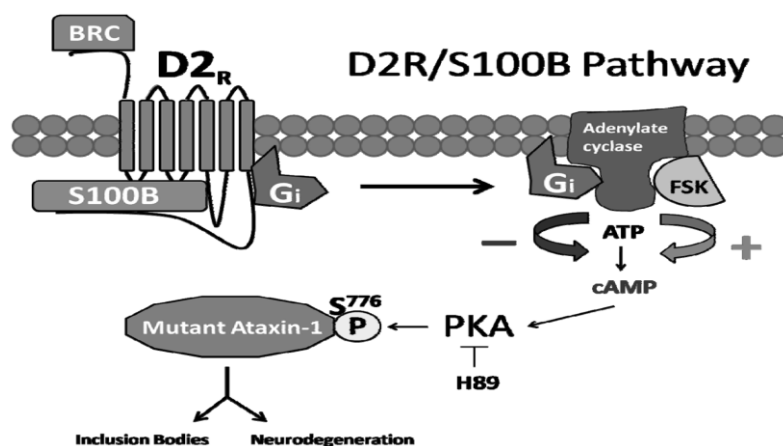


Abbildung 24: *ATXN1* Signalweg (nach Hearst et al. 2010).

Die bei SCA1 durch CAG-Repeats hervorgerufene Mutation von *ATXN1* erzeugt eine Formation von S100B enthaltenden Zytoplasmavakuolen, die sich an die dritte zytoplasmatische Schleife des D2-Rezeptors anlagern und die ihm nachgeschaltete Signalkaskade verstärken. Die am Ende dieses Signalweges stehende Phosphorylierung des Serinrests S776 führt zu einer Ataxin1-Aggregation, daraufhin zu intranukleären Inklusionen, die neurotoxische Effekte haben (Hearst et al. 2010). Die beschriebene Polyglutaminexpansion führt im Mausmodell außerdem zu transkriptionellen Veränderungen, die an Phosphatidylinositol (PI) und Calcium-Signalwegen beteiligt sind: Die zur synaptischen Transmitterfreisetzung notwendige Ca-Erhöhung ist hier verändert (Matilla et al. 1998). Das soll die paired-pulse Bahnung im Bereich CA1 des Hippocampus verringern und Lern- und Gedächtnisleistungen der Mäuse einschränken. Mutierte Polyglutaminbereiche sollen die Proteinfaltung von Ataxin1 im Mausmodell verändern (Watase et al. 2007). Beim Menschen werden Veränderungen in der Proteinfaltung von Ataxin1 mit einer Entwicklungsverzögerung, intellektuellen Einschränkungen und Verhaltensauffälligkeiten beim Menschen in Zusammenhang gebracht (Barøy et al. 2013). In einer Stichprobe von ADHS-Patienten wird eine Assoziation zwischen Intelligenz und einem SNP im zweiten Intron von *ATXN1* beschrieben (Rizzi et al. 2011). Die durch *ATXN1*-Funktionsverlust hervorgerufene Einschränkung der Gedächtnisleistung wird auch im Zusammenhang mit late-onset Alzheimer diskutiert (Zhang et al. 2010).

Funktionsveränderungen bei *ATXN1*-Mutationen oder Verlust und deren Auswirkung auf die Pathologie einiger neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen wecken das Interesse an diesem Gen als möglichen Angriffspunkt von therapeutisch eingesetzten Pharmaka. Lithium wurde in einem Tiermodell mit mutiertem *ATXN1* eingesetzt und soll hier Inositol-PKC-Signalweg und die Langzeitpotenzierung im gyrus dentatus beeinflusst und außerdem die motorische Dysfunktion und kognitive Einschränkungen verbessert haben (Watase et al. 2007). Da MPH auch eine Wirkung auf *ATXN1* zu haben scheint, könnte es sein, dass dadurch ebenfalls Kognition und Motorik beeinflusst werden.

Unseren Ergebnissen zu Folge ergab sich kein Gruppenunterschied zwischen ADHS- und Kontrollgruppe. Die bei einigen ADHS-Patienten beschriebene Haploinsuffizienz von *ATXN1* (Crespo-Barreto et al. 2010) ließe einen Unterschied in der Genexpression vermuten. Da die Stichprobe unserer Patienten allerdings klein war und keine Genotypisierung durchgeführt wurde, schließen sich die Aussagen nicht aus.

Die MPH-Behandlung führte lediglich in der ADHS-Gruppe zu signifikanten Genexpressionsveränderungen bei *ATXN1*. Kurzfristig (t1) ist die Genexpression unter MPH hoch signifikant höher ($p = 0,012$) als ohne Behandlung. Die zeitliche Dynamik der MPH-Behandlung zeigt eine Tendenz zu beschreibenden ($p = 0,057$) Expressionsanstieg nach einer Stunde (t1) und nach einem Tag (t3, $p = 0,056$)

Es wird beschrieben, dass sowohl intermittierende als auch chronische MPH-Einnahme den Dopaminsignalweg im Nucleus accumbens verändert (Calipari and Jones 2014). Da Ataxin ebenfalls mit dem Dopaminsystem interagiert, könnte es sein, dass sich diese Veränderung auch auf die Expression von *ATXN1* auswirkt und deswegen in unseren Experimenten akute und chronische Effekte detektiert werden können.

4.2 GLUT3

GLUT3, auch bekannt als *SLC2A3* (solute carrier family 2 member 3) bezeichnet einen löslichen Glukosetransporter, dessen Gen auf Chromosom 12p13.3 lokalisiert ist. Außer Glukose kann der Transporter auch Mannose, Galactose und Xylolose, nicht jedoch Fruktose transportieren.

Da *GLUT3* eine besonders hohe Affinität zu Glukose besitzt und seine Transportkapazität fünffach höher ist als bei anderen Glukosetransportern, kann er auch bei sehr kleinen Glukosekonzentrationen effektiv arbeiten. Dies ist im Gehirn der Fall, wo die Expression von *GLUT3* in Axonen, Dendriten und Zellkörpern von Neuronen gegenüber anderen Glukosetransportern überwiegt (Simpson et al. 2008). Außer in Neuronen wird *GLUT3* aber auch in Astrozyten und peripheren Blutzellen wie Lymphozyten, Monozy-

ten, Thrombozyten und Neutrophilen exprimiert. Konzentrationsveränderungen von *GLUT3* werden durch verschiedene Mechanismen hervorgerufen. Im Gehirn ist die Expression stark abhängig von Region und Aktivität, kann durch Hypoxie, Schwankungen der Glukosekonzentration und Dehydrierung beeinflusst werden und verläuft parallel zur Reifung und synaptischen Verknüpfung von Neuronen (Simpson et al. 2008). Eine Veränderung im Glukosemetabolismus kann also je nach Lokalisation unterschiedliche Auswirkungen haben. In B-Lymphozyten wird ein höherer *GLUT3*-Bedarf durch Translokation in die Zellmembran ausgeglichen, welche durch Hämagglutinin und Insulin getriggert wird.

Da ein Glukosemangel im Gehirn neurotoxische und -degenerative Folgen hat, Glukose hier aber nicht gespeichert und ein Mangel nur in Astrozyten durch β -Oxidation ausgeglichen werden kann, ist ein funktionierender Glukosetransport über den Glukosetransporter essentiell (Simpson et al. 2008). Erkrankungen und Medikamente, die den Glukosemetabolismus im Gehirn beeinflussen haben also direkte Auswirkungen auf Leistungen des Gehirns. Eine homozygote Deletion des neuronalen Glukosetransporters 3 ist nicht mit dem Leben vereinbar (Schmidt et al. 2008). Heterozygote Deletionen führen zu einer Reduktion auf mRNA- und Proteinebene um 50 %, wobei sich klinisch eine signifikant erhöhte cerebrokortikale Aktivität und höhere Sensibilität gegenüber akustischen Reizen zeigt (Schmidt et al. 2008). Auch bei ADHS wurden genetische Veränderungen beschrieben, die den Glukosemetabolismus beeinflussen. So ist die Duplikation des *GLUT3*-Gens mit ADHS assoziiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass Kinder, bei denen ADHS diagnostiziert wurde, diese Duplikation von ihren ebenfalls an ADHS erkrankten Müttern geerbt haben (Lesch et al. 2010). Außerdem wird eine durch Locus 4q32.1 regulierte geringere Expression von *GLUT3* mit Dyslexie in Zusammenhang gebracht (McNeill et al. 2011). In Übereinstimmung damit konnte gezeigt werden, dass der Glukosemetabolismus bei Patienten mit Sprachentwicklungsstörungen in frontalen, temporalen und rechten parietalen Gehirnteilen signifikant niedriger und im Okzipitallappen höher ist (Im et al. 2007). Da bei ADHS-Patienten oft eine Komorbidität mit Dyslexie beschrieben wird, sind diese Ergebnisse auch für die vorliegende Arbeit relevant (Brown 2009; Yoshimasu et al. 2011).

Hat MPH einen Einfluss auf den Glukoseumsatz des Gehirns während kognitiver Aufgaben? Interessanterweise reduziert MPH während kognitiver Aufgaben sowohl das Ausmaß der gesamten Metabolismusaktivierung als auch derjenigen in den jeweils kognitiv relevanten Regionen um 50% (Volkow et al. 2008). Allerdings ist diese Abschwächung abhängig von dem zuvor bestehenden Glukosemetabolismus. Je geringer er ausfällt, desto stärker ist die Abschwächung der Metabolismusaktivierung. Es gibt Hinweise, dass MPH die Aktivierung von Störarealen (abschweifende Gedanken) bei Personen reduziert, bei denen diese während kognitiver Aufgaben angesteuert werden (Volkow et al. 2008). Man könnte den Effekt also als fokussierte Aktivierung beschreiben. Bei Patienten, bei denen Hirnschädigungen zu Bewusstseins Einschränkungen geführt haben, kommt es unter Stimulation mit MPH hingegen zu einem signifikanten Anstieg im Glukosemetabolismus des posteromedialen Kortex des Parietallappens, die sich auch klinisch in besseren Werten des Glasgow Coma Scales (GSC) manifestieren (Kim, Shin, and An 2009). Dieser Effekt wird u.a. damit erklärt, dass MPH die Formation neuer Synapsen stimuliert und die neuronale Aktivität im retikulären aktivierenden System verstärkt (Kaelin, Cifu, and Matthies 1996).

In der vorliegenden Arbeit konnten keine signifikanten Genexpressionsunterschiede zwischen ADHS- und Kontrollgruppe ermittelt werden. Dies lässt sich nicht ohne Weiteres mit der oben erwähnten *GLUT3*-Duplikation bei ADHS in Einklang bringen. Bei einer Duplikation würde man eher eine höhere Genexpression erwarten. Liegt die Duplikation allerdings nur bei einem kleinen Teil von ADHS-Patienten vor oder führt unter Umständen gar nicht immer zu einer quantitativen Veränderung des Genprodukts, wäre ein Effekt bei unserer kleinen Stichprobengröße nicht zwangsläufig zu erwarten.

Während die MPH-Behandlung in der ADHS-Gruppe keine signifikanten Veränderungen der *GLUT3* Expression zeigte, ergaben sich in der Kontrollgruppe langfristige Genexpressionsveränderungen unter MPH. Zum Zeitpunkt t4 unterschieden sich sowohl die absoluten Werte ($p = 0,044$) als auch die Differenzen ($p = 0,033$) signifikant.

Die Wirkung von MPH unterscheidet sich also zwischen ADHS- und Kontrollgruppe. Dies bestärkt Thesen anderer Gruppen, die Unterschiede in MPH-Effekten mit einem

ADHS assoziierten Polymorphismus im D4-Gen (Michaelides et al. 2010) und dem bei ADHS erniedrigten Baseline-Glukosemetabolismus (Volkow et al. 2008) begründen. Trotzdem verwundert es, dass Methylphenidat keinen Effekt bezüglich der *GLUT3* Expression bei ADHS-Probanden hervorruft. Dies könnte daran liegen, dass ein peripheres Modell mit Lymphoblasten Veränderungen in neuronalen Zellen unzureichend wieder spiegelt. Glukose ist als Energielieferant für den Metabolismus vieler Zellen von entscheidender Bedeutung. Im Gehirn hat sie wie oben beschrieben allerdings noch eine größere Relevanz, da die Glukosekonzentration sehr viel geringer ist. Während ein Glukosemangel in peripheren Zellen auch durch andere Mechanismen kompensiert werden könnte, lässt eine Steigerung des spezifischen *GLUT3* in neuronalen Zellen eine relevante Veränderung vermuten. Ein in unserer Studie nicht als signifikant messbarer Genexpressionsunterschied in *GLUT3* bei ADHS-Probanden widerspricht daher den Ergebnissen anderer Studien nicht zwangsläufig.

Eine Genexpressionssteigerung unter MPH in der Kontrollgruppe weist auf einen MPH-Effekt bei Gesunden hin. Ob MPH eine positive Auswirkung auf Lernen und Gedächtnis hat, wird kontrovers diskutiert (Linssen et al. 2014, ter Huurne et al. 2015). Selbst wenn es keine messbaren Effekte im Alltag gäbe, könnte MPH dennoch die Genexpression beeinflussen. Auf *GLUT3* zeigt MPH unseren Ergebnissen zufolge nur langfristige Veränderungen. In den meisten klinischen Studien mit Methylphenidat bei gesunden Probanden, wird das Medikament nicht über einen so langen Zeitraum verabreicht. So lassen sich diese kurzfristigen Effekte auf Konzentration, Lernen und Gedächtnis dieser Studien an gesunden Probanden nicht mit kurzfristigen Genexpressionveränderungen unserer Studie in Einklang bringen.

4.3 GUCY1B3

GUCY1B3 kodiert für die β -Untereinheit der löslichen Guanylatcyclase (sGC), die an Neurotransmission, Regulation glatter Muskulatur, Thrombozytenfunktion, mitochondrialer Biogenese und Zellproliferation beteiligt ist (Ibrahim et al. 2010). Dieses Enzym ist ein Heterodimer aus einer α - und einer β -Untereinheit, wobei *GUCY1B3* essentieller Partner für beide α -Untereinheiten ist (Chang et al. 2011). Die Untereinheiten haben große Ähnlichkeiten am C-terminalen Ende, unterscheiden sich aber am N-Terminus (Swati et al. 2012). Die C-terminale Hälfte beider Untereinheiten ist notwendig, um eine funktionelle katalytische Einheit mit cGMP-Bildungs-Aktivität auszubilden (Ibrahim et al. 2010). Der N-Terminus der β -Untereinheit ist an der Interaktion mit anderen Molekülen und der Häm-Bildung beteiligt und damit unverzichtbar für die NO-Rezeptorfunktion (Hanafy, Martin, and Murad 2004; Swati et al. 2012). Außerdem besitzt die sGC drei intramolekuläre Disulfidbrücken und ist hoch glykosyliert an Asparaginresten (Potter 2011). Die β -Untereinheit wird in Gehirn, Lunge, Knochen, Herz und Ovar exprimiert (Potter 2011). Dabei werden *GUCY1A3/GUCY1B3*, die zusammen einen NO-Rezeptor bilden, in den meisten Geweben exprimiert, *GUCY1A2/GUCY1B3* hingegen prädominant im Gehirn, u.a. im Hippocampus (Chang et al. 2011; Hanafy, Martin, and Murad 2004). Die sGC liegt sowohl zytosolisch als auch perinukleär vor und kann in Membranen tranlokalisiert werden (Balashova et al. 2005; Hanafy, Martin, and Murad 2004).

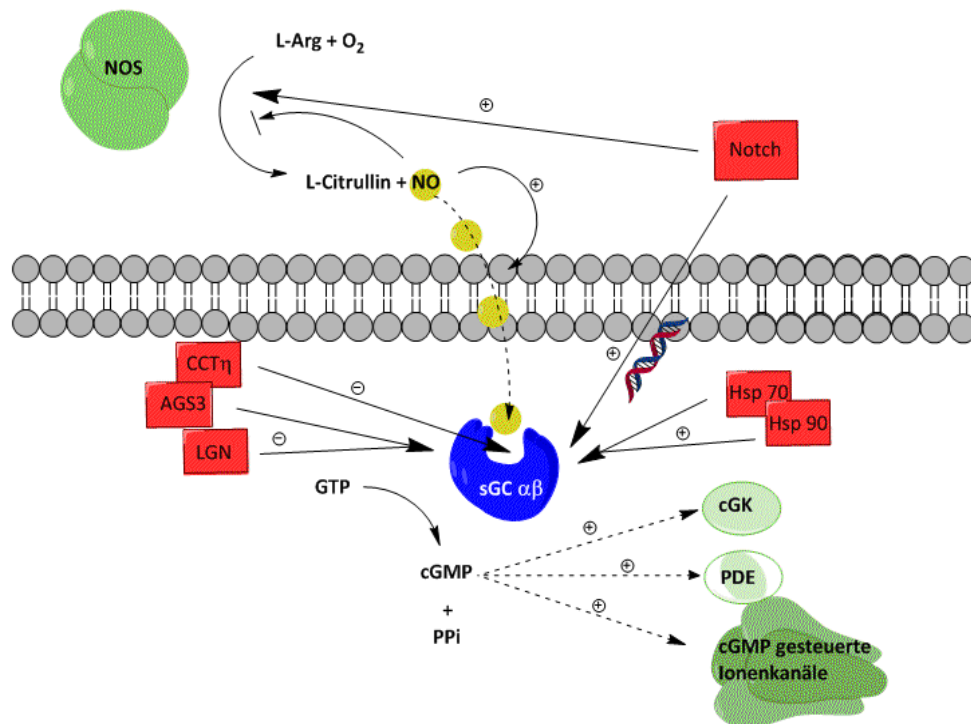


Abbildung 25: GUCY1B3: sGC-Signalweg

Die sGC stellt den unter physiologischen Bedingungen bisher einzigen NO-Rezeptor im engeren Sinne dar (Derbyshire and Marletta 2009). Alle NO-Moleküle im Körper binden spezifisch an die Hämgruppe der sGC. Dadurch wandelt diese Guanosintriphosphat (GTP) in zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) um, das weitere Signalmoleküle wie Phosphodiesterasen (PDE), cGMP-abhängige-Kinasen (cGK) oder Ionenkanäle ansteuern kann (Ibrahim et al. 2010; Potter 2011). Da NO sehr schnell zu Nitrit oder Nitrat umgewandelt wird, ist die hohe Affinität zur sGC, die die Mehrheit der NO-Effekte mediiert, von großer Bedeutung (Chang et al. 2011; Hallén et al. 2001). Da die Aktivität der sGC maßgeblich von der NO-Konzentration abhängig ist, ist die Regulation der NOS in diesem Signalweg entscheidend. Es existieren drei Isoenzyme der NOS: NOS-III in Endothelzellen, NOS-II in Makrophagen/Mikrogliazellen und NOS-I in Neuronen. Durch Rückkopplungsmechanismen reguliert NO seine Synthese und Freisetzung: NO-Akkumulation verstärkt (entweder durch cGMP oder einen von cGMP induzierten Me-

diator) die NO-Freisetzung, inhibiert aber seine Synthese durch negative Rückkopplung der NOS (Hallén et al. 2001).

sGC/cGMP-Signalwege sind in vielen autonomen Neuronen präsent (Hallén et al. 2001). So sind *GUCY1A3* und *GUCY1B3* mit sechs der zwischen Individuen sehr variabel ausgeprägten Untereinheiten des GABA-A-Rezeptors assoziiert und beeinflussen sehr wahrscheinlich seine Expression in GABAergen Synapsen des menschlichen Gehirns (Mulligan et al. 2012). Die meist inhibitorischen GABAergen Signalwege können durch retrograde NO-vermittelte Aktivierung der präsynaptischen sGC und der damit verbundene cGMP-Produktion verstärkt werden (Mulligan et al. 2012). Auch das dopaminerge System wird durch sGC und NO beeinflusst: Die Prepulse Inhibition (PPI), die notwendig ist, um irrelevante sensorische, motorische oder kognitive Informationen zu filtern oder auszublenden, wird durch NO und sGC modulierte dopaminerge Signalwege in mesokortikolimbischen Arealen reguliert (Issy, Salum, and Del Bel 2009). So ist es nicht verwunderlich, dass der NO/sGC/cGMP-Signalweg eine wichtige Rolle bei Lernvorgängen und komplexen Verhaltensweisen spielt. Durch ihn werden Langzeitveränderungen von synaptischer Plastizität im Hippocampus, Amygdala und Kleinhirn moduliert (Chen et al. 2011; Kleppisch and Feil 2009). Auch in der Pathogenese von Angst, Sucht, Depression und Schizophrenie sind cGMP-Signalwege involviert (Kleppisch and Feil 2009). Dysregulierte NO-Systeme werden mit Stress-bezogenen Erkrankungen in Verbindung gebracht: Gesteigerte NO-sGC-cGMP-Signalwege unterstützen die Entwicklung von Stress-induzierter Anhedonie, einem Leitsymptom von Depression (Yazir, Utkan, and Aricioglu 2012). Es konnte gezeigt werden, dass Nitrat im Plasma, ein Indikator der NO-Produktion, bei Depressiven deutlich erhöht ist (Suzuki et al. 2001). Bei ADHS-Patienten hingegen wurden verringerte NO-Level im peripheren Blut gefunden (Selek 2008). Ein Polymorphismus im NOS1-Promotor wird mit hyperaktivem und aggressivem Verhalten und einer geringeren Aktivität im ACC (Ort der Emotionsverarbeitung und Verhaltenskontrolle) assoziiert (Reif 2009). Eine durch einen Promotor-Polymorphismus (NOS1 ex1f-VNTR) hervorgerufene geringere NOS1-Expression im Striatum wird mit impulsivem Verhalten assoziiert (Freudenberg 2015). In einer anderen Studie zeigt die mit ADHS assoziierte NOS1 Variante (kurzes Allel) allerdings eine erhöhte striatale Aktivität

(Hoogman 2010). Demzufolge steht die Aktivität des Striatums vermutlich nicht in einem direkten Zusammenhang mit der NOS1-Expression. Eine mit der NOS zusammenhängende reduzierte NO-Aktivität im präfrontalen Kortex wird mit Schizophrenie und Kognition in Verbindung gebracht (Freudenberg 2015).

Der NO-sGC-cGMP-Signalweg ist daher als Angriffspunkt von Pharmaka von großem Interesse. MPH induziert – allerdings nur in hoher (20-30mg/kg), nicht in geringer (10mg/kg) Dosierung – eine sGC-medierte PPI-Unterbrechung (Issy, Salum, and Del Bel 2009). Dies verwundert zunächst, da MPH zugeschrieben wird, die Konzentrationsfähigkeit und damit auch die PPI zu steigern (Ashare et al. 2010). Offensichtlich ist dieser MPH-Effekt auch abhängig von der Vorbehandlung der Probanden. Es wurde beobachtet, dass das Medikament in geringer Dosierung (0,3mg/kg) zu einer PPI-Steigerung bei noch unbehandelten ADHS Patienten führt, bei bereits prämedizierten Patienten allerdings nur in hoher Dosierung diesen Effekt erzielen kann (Ashare et al. 2010). Auch bei Depression konnte der NO-sGC-cGMP-Weg medikamentös beeinflusst werden: ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-one), ein selektiver sGC-Inhibitor schützt den Hippocampus vor stress-induzierten Schäden und supprimiert depressionsähnliche Verhaltensänderungen, die durch chronischen unvorhersagbaren Stress hervorgerufen werden, und steigert Stimmung, Glukose-Aufnahme, Gewicht und Bewegung von Mäusen (Yazir, Utkan, and Aricioglu 2012). Auch Alkohol beeinflusst den Signalweg, indem er im Ncl. accumbens signifikante Genexpressionsveränderungen von *GUCY1B3* hervorruft (Bell et al. 2009).

Unseren Ergebnissen zu Folge ist die Genexpression von *GUCY1B3* bei ADHS zu allen Messzeitpunkten signifikant bzw. tendenziell höher als bei der Kontrollgruppe. Da sich die in anderen Studien beschriebenen Veränderungen bei psychiatrischen Krankheiten allerdings meistens auf die Signalkaskade und nicht die Genexpression von *GUCY1B3* beziehen, ist es schwierig, diese Aussagen mit unseren Ergebnissen zu vergleichen. Man kann spekulieren, dass eine höhere sGC-Expression zu gesteigerter PPI-Disruption führen könnte und eine demzufolge verringerte PPI mit erhöhter Ablenkungsbereitschaft während Lernvorgängen im Zusammenhang steht.

Außerdem könnte der mit ADHS assoziierte NOS-Polymorphismus die sGC beeinflussen. Eine veränderte NOS-Funktion bzw. geringere NOS-Expression lässt auch eine geringere oder zumindest veränderte NO-Produktion erwarten. Diese wiederum ist direktes Target für die sGC, von der eine Untereinheit durch *GUCY1B3* gebildet wird. Eventuell wird eine geringere NO-Konzentration bei ADHS durch eine gesteigerte *GUCY1B3*-Expression kompensiert.

4.4 HEY1

HEY1 (hairy enhancer of split related with YRPW motif 1, auch bekannt als *CHF2*; *OAF1*; *HERP2*; *HESR1*; *HRT-1*; *BHLHb31*) fungiert als Transkriptionrepressor und ist an Angiogenese, Somitogenese, Myogenese und retinaler Gliogenese beteiligt (Iso, Kedes, and Hamamori 2003). Mit seiner bHLH (basic helix loop helix) Domäne, die einen Glycinrest enthält, kann er mit N-CoR, mSIN3A und HDA1C einen Co-Repressor-Komplex bilden und an DNA binden (Fuke, Sasagawa, and Ishiura 2005; Iso, Kedes, and Hamamori 2003). Das Carboxy-terminale Ende enthält ein YRPW Motiv und eine TE (V/1) GAF-Region. Der *HEY1*-Promotor wird von einer intrazellulären konstitutiv aktivierten Notch Domäne (NICD) aktiviert und wirkt dann als primärer Effektor auf die folgenden Ebenen der Notch-Signalkaskade. Obwohl *HEY1* auch zusammen mit *HES* als Heterodimer an dieselbe DNA-Zielsequenz bindet und im Komplex sogar stärkere Repressorwirkungen entfaltet, kommt er auch alleine in Zellen vor und steuert dann andere Signalwege an als HES. Es konnte eine gegenseitige Regulation zwischen *HEY1* und *HES* beobachtet werden (Sakamoto et al. 2003). Des Weiteren wird *HEY1* von p53, TAp63a und TAp73 reguliert: Sie supprimieren seine endogenen Proteinlevel, indem sie die über die intrazelluläre Notch-1-Domäne (N1^{ICD}) ausgelöste Transkriptionsaktivierung antagonisieren (Hooper et al. 2006; Huang et al. 2004). Auch andere Signalwege werden von *HEY1* angesteuert. So konvertiert der *HEY1*-Leu94Met-SNP *HEY1* von einem Androgenrezeptor-Korepressor zu einem Koaktivator (Villaronga et al. 2010).

Neben anderen Krankheiten spielt *HEY1* auch in neuropsychiatrischen Erkrankungen eine Rolle. Der Notch-Signalweg inhibiert die neuronale Differenzierung von Vorläufer-

zellen, die so in einem undifferenzierten Zustand verbleiben (Ishibashi et al. 1994; Sakamoto et al. 2003). Varianten im Notch4-Gen wurden als prädisponierend für Schizophrenie angesehen (Shayevitz et al. 2012). Der C386A SNP wird mit polygenen Erkrankungen assoziiert, die das Dopaminsystem beeinflussen (Fuke, Sasagawa, and Ishiura 2005). Eine Hochregulation von *HEY1* steht im Zusammenhang mit Autismus-Spektrum-Störungen (ASD) (Ghahramani Seno et al. 2011).

Die folgende Darstellung soll die Interaktionen von *HEY1* veranschaulichen. Die umkreisten Ziffern im folgenden Text beziehen sich auf diese Abbildung.

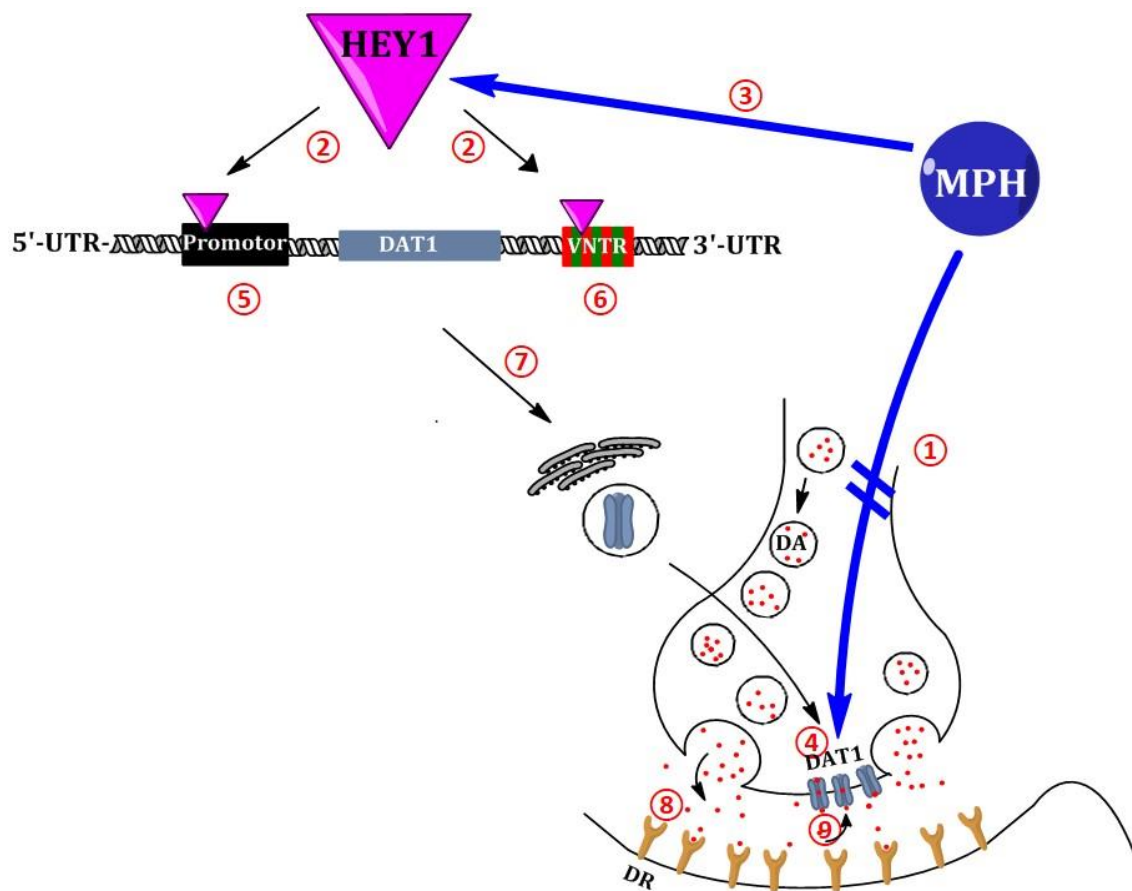


Abbildung 26: *HEY1* Signalweg

HEY1 könnte auch eine Rolle in der Pathogenese des ADHS spielen, insbesondere durch seinen Einfluss auf das Dopaminsystem. Die *HESR*-Familie agiert im mesostrialen und mesokortikolimbischen Dopaminsystem, das an motorischer Kontrolle, Emotion und Kognition beteiligt ist (Björklund and Dunnett 2007). *HEY1*-knock-out-Mäuse bewegen

sich weniger, zeigen reduziertes exploratives Verhalten und eine Hochregulation in den Dopaminrezeptoren D1, D2, D4, D5 [Abbildung 26, DR] und im Dopamintransporter DAT1 ④ (Fuke, et al., 2006). DAT1-knock-out-Mäuse hingegen zeigen hyperaktives Verhalten und eine geringere Dopaminkonzentrationen in präsynaptischen Terminalen (Fuke, Sasagawa, and Ishiura 2005). *HEY1* bindet mit seiner bHLH-Domäne an den Promotor und die VNTR-Region am 3'-UTR Ende des *DAT1*-Gens (Kanno and Ishiura 2011). Polymorphismen im Core-Promotor des *DAT1*-Gens (Ohadi et al. 2006) sowie der VNTR-Region (Bannon et al. 2001; Brookes et al. 2007; Hawi et al. 2010) stehen im Zusammenhang mit ADHS und werden in der Wirkungsweise bei therapeutischem Einsatz von MPH kontrovers diskutiert. Während einige Forschungsergebnisse einen direkten Zusammenhang zwischen VNTR-Polymorphismus und MPH-Response propagieren (Joober et al. 2007; Kooij et al. 2008), weisen andere diesen Zusammenhang zurück (Contini et al. 2012; Gill et al. 2012). Möglicherweise ist der inhibitorische Effekt von *HEY1* auf den *DAT1*-Promoter ⑤ auch abhängig von der Repeatanzahl der VNTR-Region, was allerdings nicht in allen Zelltypen nachgewiesen werden konnte (Fuke et al. 2006). Ein Grund dafür könnte sein, dass *HEY1* im Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren wirkt und diese nicht von allen Zellen exprimiert werden (Kanno and Ishiura 2011).

Im Gegensatz zu Studien, die zeigen, dass MPH die Dopaminwiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt über DAT1 inhibieren ⑤ (Challman and Lipsky 2000), wurden in der vorliegenden Arbeit im peripheren Modell direkte Effekte von MPH auf *HEY1* untersucht ③. Da *HEY1* und *DAT1* laut den genannten Studien interagieren, ist es interessant zu überprüfen, ob sich die Ergebnisse dieser Arbeit mit den anderen Studien in Zusammenhang stellen lassen. Dabei ist stets zu bedenken, dass die hier vorgenommenen Versuche mit Lymphozyten durchgeführt wurden. Diese können zwar ebenfalls *DAT1* exprimieren, allerdings dadurch keinen direkten Einfluss auf eine neuronale Transmitterübertragung nehmen.

Es konnte ein signifikanter Behandlungseffekt bei der Kontrollgruppe, nämlich eine Hochregulation, eine Woche nach Inkubationsbeginn nachgewiesen werden. Auch zu

fast allen anderen Zeitpunkten zeigt sich bei der Kontrollgruppe eine höhere *HEY1*-Expression während der MPH-Behandlung. Bei den ADHS-Zellen hingegen fällt die *HEY1*-Expression unter MPH-Behandlung meistens numerisch geringer aus, wodurch das Expressionslevel dem der gesunden Kontrollprobanden angenähert wird.

Betrachtet man alle erwähnten Funktionen und Interaktionen von *HEY1* im Zusammenhang mit dem Dopaminsystem sowie den Einfluss von MPH, kann man folgende Spekulationen anstellen: Bei gesunden Kontrollprobanden steigert unseren Ergebnissen zu Folge MPH die Expression von *HEY1* ③. Vorausgesetzt dieser Effekt ließe sich auch in neuronalen Zellen reproduzieren, resultierte - unter Annahme des beschriebenen Modells – die konsequente Signalkaskade über den Kernpromotor ⑤ und die VNTR-Region am 3'-UTR-Ende des *DAT1*-Gens in einer verminderten *DAT1*-Expression ⑦. Daraus folgte eine Steigerung der Dopaminkonzentration im synaptischen Spalt ⑧, da über *DAT1*-Transporter insgesamt weniger Dopamin in die präsynaptische Membran aufgenommen werden könnte ⑨. Das Endresultat wäre also mit der Annahme, dass MPH die Dopaminwiederaufnahme inhibiert und damit die DA-Konzentration im synaptischen Spalt steigert, vereinbar. Man würde also denselben Effekt auch bei Zellen von ADHS-Patienten erwarten. Unseren Ergebnissen zufolge lässt sich diese Hypothese im peripheren Modell allerdings nicht entsprechend nachvollziehen. Eine MPH-Behandlung bei ADHS-Probanden verändert die *HEY1*-Genexpression nicht signifikant. Es könnte sein, dass sowohl eine zu hohe (z.B. *HEY1*-Funktionsverlust) als auch eine zu niedrige *DAT*-Expression (kompletter *DAT*-knock-out) in einer verminderten DA-Konzentration im synaptischen Spalt resultiert und so zur ADHS-Symptomatik führt: Sind sehr viele *DAT1* vorhanden, wird die DA-Konzentration im synaptischen Spalt dramatisch verringert. Sind gar keine *DAT1* vorhanden, kann DA nicht in die präsynaptische Membran wiederaufgenommen werden, was durch Neusynthese nur bedingt kompensiert werden kann. Insgesamt ist die DA-Konzentration im synaptischen Spalt also kurzfristig höher, langfristig aber reduziert.

Neueste Forschungen lassen jedoch vermuten, dass chronische MPH-Behandlung (1 Jahr) weder einen direkten Einfluss auf *DAT1* noch auf D2 oder D3 hat (Gill et al. 2012).

Dies entspricht dem obigen Modell, bei dem DAT1 nur indirekt über einen MPH-Einfluss auf *HEY1* verändert wird, in unserer Studie nach auch eher langfristig (T3).

Allerdings basieren Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zum einen auf einem wesentlich kürzeren Beobachtungszeitraum (2 Wochen), zum anderen könnten weitere zwischengeschaltete Faktoren die Signalkaskade zwischen MPH, *HEY1* und DAT1 beeinflussen. Wie schon erwähnt handelt es sich bei den vorliegenden Versuchen um ein peripheres Modell mit Lymphoblasten. Vorgänge an neuronalen Synapsen und Transmitterfreisetzungen mit neuronaler Signalfortleitung können hier nicht nachvollzogen werden. Ebenso wenig kann man sicher davon ausgehen, dass die Signalkaskaden von peripheren und neuronalen Zellen identisch sind.

4.5 MAP3K8

Die Mitogen-aktivierte Kinase Kinase Kinase 8 (*MAP3K8*) kodiert für eine Serin-/Threonin- Proteinkinase, die sowohl Bestandteil des MAPkinase als auch JNK-Kinase- und p38-Signalweges ist, in denen sie ERK, c-Jun N-terminale-Kinasen und p38 mitogen-aktivierte Kinasen ansteuert (Luciano et al. 2004). Während sie selbst durch Auto-regulation und Dimerisierung aktiviert wird, sind ihr wiederum noch zwei weitere MAP-Kinasen nachgeschaltet, die sie durch Phosphorylierung aktiviert und die zur Namensgebung *MAP3K8* geführt haben. Sie besitzt eine große regulatorische Domäne und aktiviert u.a. durch Ubiquitinierung die Produktion von NFκB, TNFα- und IL2 während der Aktivierung von T-Lymphozyten.

Außerdem ist die *MAP3K8* ein entscheidendes Bindeglied im Corticoliberin (CRF)-gesteuerten Proopiomelanocortin (POMC)-Signalweg (s. Abbildung 27), (Zhang et al. 2013). Dabei wird die Kinase selbst nach Stimulation durch CRF zum einen durch PKA-Phosphorylierung aktiviert, zum anderen durch die miR-375, die direkt an ihr 3'-UTR-Ende bindet, gehemmt. Über die nachgeschalteten Moleküle ERK1/2 und NGFI-B fördert sie so die Transkription von POMC, dem Vorläuferpeptid von ACTH. Bei ADHS-Patienten wird eine Dysfunktion in der Hypothalamus-Hypophysen-Achse diskutiert: Unter Stress zeigt sich eine Unterfunktion dieser Achse, aber auch unter stressfreien

Bedingungen sind die Cortisollevel bei ADHS-Patienten gegenüber gesunden Kontrollen signifikant erniedrigt (Ma et al. 2011; van West, Claes, and Deboutte 2009).

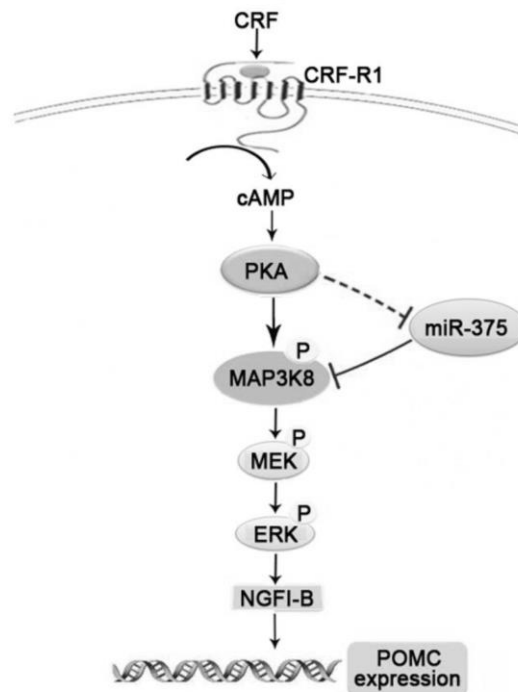


Abbildung 27: MAP3K8-Signalweg (Zhang et al. 2013)

JNK-Kaskaden reagieren auf diverse Stress-Faktoren und steuern Apoptoseprozesse in der frühen Gehirnentwicklung (Qi and Elion 2005; Takeda and Ichijo 2002). Auch der p38-Signalweg ist hieran beteiligt. Zu seinen Targets, die von MAPK phosphoryliert werden, zählen ATF2 (Komponente des Aktivator-Proteins AP-1), CREB (cAMP-Aktivierung induziert neuronale Differenzierung), CHOP, MEF2, ELK-1, Sap-1A und Max (Takeda and Ichijo 2002). ERK (Extracellular signal-regulated)-Signalkaskaden haben Einfluss auf die Knüpfung und den Erhalt synaptischer Verbindungen und spielen in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle bei Lernvorgängen und Gedächtnisbildung in Nervenzellen, ins Besondere bei der Langzeitpotenzierung im Hippocampus und der langfristigen synaptische Plastizität in dopaminergen striatalen Neuronen, die hierzu sowohl eine D1 als auch eine NMDA-Stimulation erhalten müssen (Takeda and Ichijo 2002; Valjent et al. 2005). Der ERK-Signalweg wird im Präfrontalen Kortex (PFC) durch Stimulanzen wie D-Amphetamin, allerdings nicht durch MPH beeinflusst: D-

Amphetamin erhöht die Phosphorylierung von ERK, woran diverse Transmitter (Adrenalin, Serotonin, NMDA) beteiligt sind (Pascoli et al. 2005). Diese Erhöhung führte bei Mäusen zu Hyperlokomotion.

Unseren Ergebnissen zu Folge gibt es keinen signifikanten Unterschied in der Genexpression von *MAP3K8* zwischen ADHS- und Kontrollprobanden. Die MPH-Behandlung führt bei ADHS-Probanden jedoch kurzfristig (t1) zu einem tendenziell geringeren Expressionsanstieg ($p = 0,09$) verglichen mit der unbehandelten Gruppe.

Eine Erniedrigung der *MAP3K8*-Level wirkt sich wiederum auf die nachgeschaltete Signalkaskade aus. Die beschriebenen Signalkaskaden sind hauptsächlich im Gehirn lokalisiert. Periphere Lymphozyten können eine intakte Blut-Hirnschranke in der Regel nicht passieren. Wenn man nun die vorliegenden Versuche als ein Modell verwenden möchte, um die Wirkungsweise von MPH nachzuvollziehen, muss man entweder annehmen, dass MPH im Gehirn *MAP3K8* auf ähnliche Weise beeinflusst oder aber zumindest einzelne Stufen der peripheren Signalkaskade mit Signalkaskaden im Gehirn interagieren oder Rückkopplungsvorgänge vorliegen. Niedrigere Expressionswerte bei der ADHS-Gruppe unter MPH könnten dann auf Unterschiede in Lern- und Gedächtnisvorgängen sowie der Regulation von Stresshormonen hinweisen.

Unter MPH-Behandlung wird ein Expressionsanstieg verzeichnet. Dieser tritt zwei Wochen nach Inkubationsbeginn ein, allerdings kann der Effekt nur in der Kontrollgruppe als hoch signifikant ($p = 0,005$) beschrieben werden. Man könnte also vermuten, dass MPH auch bei Gesunden die genannten Bereiche beeinflusst. Ob MPH auch eine Wirkung auf die Lern- und Gedächtnisfunktion gesunder Probanden haben könnte, wird kontrovers diskutiert (Linssen et al. 2014, ter Huurne et al. 2015). Es ist also durchaus möglich, dass an einer bei ADHS und MPH-Medikation veränderten Lern- und Gedächtnisfunktion der *MAP3K8*-Signalweg beteiligt ist. Unter Stimulation mit D-Amphetamin konnte eine erhöhte Phosphorylierung von ERK bei gesunden Mäusen beobachtet werden (Pascoli et al. 2005). Da dieses Protein durch eine von *MAP3K8* aktivierte Proteinkinase phosphoryliert wird, lässt sich auch hier ein Zusammenhang vermuten. Allerdings konnte die Veränderung nicht mit MPH gezeigt werden. Vielleicht

gibt es noch weitere Einflussfaktoren zwischen den beiden Molekülen, die einen direkten Einfluss verhindern.

4.6 NAV2

Das in *Caenorhabditis elegans* exprimierte *unc-53* hat drei humane Homologe *NAV1*, *NAV2* und *NAV3*, von denen ihm *NAV2* am meisten ähnelt und sogar als Ortholog bezeichnet werden kann (Katidou, Tavernarakis, and Karagogeos 2013; Muley et al. 2008; Tamara Maes 2002). Es liegt auf Chromosom 11p15.1 und zeigt hohe Expressionswerte sowohl im embryonalen als auch adulten Nervensystem, außerdem in Nieren- (Maximalwerte) und Lebergewebe aber auch in Herz, Plazenta und Lunge (Muley et al. 2008; Peeters et al. 2004; Tamara Maes 2002). Im Nervensystem wird *NAV2* vor allem in Zellkörpern und Ausläufern von wachsenden Neuriten, Motoneuronen und im inneren Teil der äußeren Körnerschicht exprimiert (McNeill et al. 2011; Muley et al. 2008; Schmidt et al. 2009). Geringere *NAV2*-Konzentrationen führen zu einer Verringerung der Nervenzellichte (McNeill et al. 2010). Durch alternatives Spleißen existieren von *NAV2* Transskripte verschiedener Längen, die hoch gewebespezifisch erscheinen (Tamara Maes 2002). Vor allem Exon 13 und 16 sind variabel (McNeill et al. 2010; Tamara Maes 2002). Das Protein besitzt unter anderem eine Domäne zur Zytoskelettinteraktion mit Mikrotubuli und eine ATP/GTP-Bindungsstelle (Muley et al. 2008; Stringham et al. 2002; Tamara Maes 2002).

Da die Expression von *NAV2* durch all-trans Retinsäure sehr schnell (innerhalb von 4 Stunden) induziert wird, wurde es zunächst als *RAINB1* (retinoic-acid-induced in neuroblastoma 1) bezeichnet (McNeill et al. 2010; Merrill et al. 2002). All-trans Retinsäure (RA) ist essentiell für eine normale Entwicklung des Nervensystems (McNeill et al. 2010). Außerdem steigert RA die Ausbildung von Neuriten (Muley et al. 2008). Bei diesem Vorgang sind Mikrotubuli beteiligt, die auch von *NAV2* gesteuert werden (Muley et al. 2008). *NAV2* steuert die Ausbildung von Kanälen in exkretorischen Zellen, Aktinzytoskelettremodelling, Tubulogenese, Axonelongation, -abzweigung und -navigation, die zur Körnerzellreifung notwendige Ausbildung paralleler Axonfasern,

Prämigration der Körnerzellen, spielt eine Rolle in frühen Faltungsprozessen und später in der Folia-Formation und Lagebestimmung des Kleinhirns (McNeill et al. 2011; Muley et al. 2008; Schmidt et al. 2009). Eine hypomorphe Ausbildung von NAV2 führt zu eingeschränkten Sinneswahrnehmungen (Riechen, Hören und Sehen), verringertem Schmerzempfindung, einer gestörten Blutdruckregulation und eingeschränkter Herzfrequenzvariabilität (Muley et al. 2008; Peeters et al. 2004; McNeill et al. 2010). NAV2 homozygot mutierte Mäuse zeigen Ataxiesymptomatik (McNeill et al. 2011). So beeinflusst NAV2 Reaktionen des Körpers auf die Umwelt und wird auch mit multifaktoriellen Erkrankungen wie bipolarer Störung, ADHS und Autismus assoziiert (Franke, Neale, and Faraone 2009). Ein rezessiver SNP (rs874426) wird mit früher Manifestation von ADHS in Zusammenhang gebracht (Franke, Neale, and Faraone 2009).

In unseren Versuchen konnte nur im Microarray eine signifikant höhere Expression von NAV2 bei ADHS-Probanden gezeigt werden. Gruppenunterschiede zwischen ADHS und Kontrolle konnten in der qRT PCR nicht verifiziert werden. Die Behandlung mit MPH führte in der ADHS-Gruppe zu einer kurzfristig (t1) hoch signifikant ($p = 0,001$) höheren Genexpression gegenüber der Kontrollgruppe. Da NAV2 besonders im sich entwickelnden Gehirn eine entscheidende Bedeutung hat, könnte eine Veränderung durch MPH-Medikation einen Einfluss auf die Gehirnentwicklung haben. Allerdings ließe sich eine solche besser mit einer langfristigen Genexpressionsveränderung vereinbaren.

4.7 Limitationen

In der vorliegenden „Pilotstudie“ wurde untersucht, ob ein Zellkulturmodell mit peripheren Zellen weitere Informationen über die Genexpression bei ADHS und über den Einfluss von MPH auf molekularer Ebene generieren kann. Die dargestellten Ergebnisse müssen allerdings unter Beachtung zahlreicher Limitationen interpretiert werden.

Die Stichprobengröße der Studie war mit zehn Probanden und zehn Kontrollen, insbesondere um geringe Genexpressionsveränderungen statistisch valide erfassen zu können, sehr klein. Gerade bei einer so heterogenen Erkrankung wie ADHS muss man von deutlichen interindividuellen Unterschieden zwischen den Probanden einer kleinen

Stichprobe ausgehen. Zudem wurden ohne vorausgehende Genotypisierung heterogene ADHS-Patienten und Kontrollen untersucht. Risikogenvarianten wurden daher nicht erfasst.

Es wurde nicht zwischen MPH-Respondern und Non-Respondern unterschieden. Vorhandene MPH-Effekte, die nur bei Respondern zu finden sind, könnten also durch die Non-Responder demaskiert worden sein. Außerdem lässt sich nicht ausschließen, dass detektierte Genexpressionsveränderungen gegebenenfalls auch durch die in dieser ADHS-Stichprobe gehäufte Komorbidität Depression und nicht durch ADHS hervorgerufen wurde. Die ADHS-Patienten nahmen teilweise andere Psychopharmaka ein, die ebenfalls die Genexpression beeinflussen könnten. Dies sollte durch das mehrfache Passagieren allerdings ausgeglichen worden sein. Außerdem unterschied sich das Geschlechterverhältnis zwischen ADHS- und Kontrollprobanden, was ebenfalls die Genexpression beeinflussen kann.

Um ein Modell zu entwickeln, dass die Pathogenese von ADHS und die Wirkungsweise von MPH möglichst gut den physiologischen Bedingungen annähert, hätte sich eine Zellkulturmodell mit neuronalen Zellen sicherlich besser geeignet. Die pharmakologischen Zielmoleküle von MPH befinden sich vor allem in den Hirnregionen Striatum und im Frontalhirn. Im Striatum hemmt MPH die Wiederaufnahme von Dopamin und sorgt für eine bessere Dopaminverfügbarkeit. Im Frontalhirn stimuliert es die Noradrenalin- und Dopaminrezeptoren der angesteuerten Neurone. Diese und vermutlich auch weitere Wirkungen können sich an Lymphoblasten aufgrund der unterschiedlichen Zellstruktur und -funktion nicht untersuchen lassen.

Einige Gründe sprachen aber dafür, ein Modell mit lymphoblastoiden Zelllinien zu verwenden. Lymphoblastoide Zellkulturmodelle erfüllen die Bedingungen, die zur Beantwortung unserer Fragestellung notwendig waren: Es handelt sich um periphere Zellen, die man von Probanden leicht gewinnen und unter gewöhnlichen Zellkulturbedingungen passagieren und mit MPH inkubieren kann. Sie vermehren sich schnell genug, um innerhalb des Versuchszeitraums genügend Material für Genexpressionsanalysen zu liefern. Außerdem lassen sie sich mit einem – entsprechend unseren Möglichkeiten

und Vorgaben – methodisch und finanziell realisierbarem Aufwand herstellen. So konnten größere Probenmengen hergestellt werden, die für einige Methoden vorausgesetzt wurden und auch die Wiederholung einzelner Versuchsabschnitte ermöglichte.

Aus der Verwendung eines Zellkulturmodells ergeben sich noch weitere Limitationen. Aus den Vorversuchen zur MPH-Halbwertszeit unter Kulturbedingungen geht hervor, dass man die Zellen theoretisch mehrfach täglich mit neuem Medium hätte inkubieren müssen, um eine Steady State zu erreichen. Bei einem Mediumwechsel ließen sich Temperatur-, Licht- und Luftgasveränderungen, sowie Aufwirbelungen (mechanische Krafteinwirkung) auf die Zellen genau wie wechselnde Ionen und Stoffkonzentrationen in der Zellumgebung nicht vermeiden. Häufigere Mediumwechsel hätten den Stress für die Zellen weiter erhöht und eventuell ihren Stoffwechsel und auch die Genexpression beeinflusst. Darum war eine Inkubationsfrequenz von mehr als einmal in 24 Stunden nicht zu vertreten. Eine andere Überlegung war, die Inkubationskonzentration von MPH im Medium anzuheben, um im Mittel die Zielkonzentration von 30 ng/μl zu erreichen. Allerdings werden MPH-Konzentrationen im menschlichen Blut von über 30 ng/μl nicht empfohlen. Genexpressionsänderungen, die evtl. nur bei höheren Konzentrationen eintreten, hätten also ein verzerrtes Modell darstellen können und waren nicht Ziel dieser Arbeit. Im klinischen Alltag werden sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern Retardpräparate eingesetzt, die den Wirkstoff MPH kontinuierlich freisetzen. Dieser einigermaßen gleichmäßige Medikamentenspiegel konnte im vorliegenden Experiment nicht erreicht werden. Bei Kindern wird oft allerdings zusätzlich ein nicht retardiertes Präparat eingesetzt, sodass auch im klinischen Alltag Schwankungen in der Blutkonzentration entstehen.

Betrachtet man die Ergebnisse, fällt auf, dass die Expression aller untersuchten Gene unabhängig von Probandenstatus oder Behandlung jeweils mit dem Entnahmezeitpunkt zunimmt. Dies könnte in einer Expressionsinduktion durch EBV oder vermehrte Zell-Zellkontakte durch steigende Zellkonzentrationen begründet sein. Allerdings müsste man dann davon ausgehen, dass die Housekeepinggene von dieser Induktion weitestgehend ausgeschlossen waren, da der Effekt sonst durch die Normalisierung der

Ergebnisse herausgerechnet worden wäre. Durch die Transformation der Lymphoblasten mit EBV sind weitere Genexpressionsveränderungen möglich, die in dieser Studie nicht erfasst werden konnten.

Teilweise stimmten die Ergebnisse der Microarrayanalyse nicht mit denen der qRT PCR überein. Das könnte daran liegen, dass im Microarray nur Probenpools der Zeitpunkte t0 und t4 betrachtet wurden, während in der qRT PCR alle RNA-Proben einzeln untersucht wurden.

Die Ergebnisse der Microarray-Untersuchung wurden für multiples Testen mittels FDR korrigiert. Dies führte dazu, dass nur marginal signifikante Expressionsunterschiede zu sehen waren. Aus den im Microarray untersuchten Genen wurden einige für die anschließenden Versuche mittels qRT PCR ausgewählt. Die Ergebnisse der qRT PCR wurden nicht mehr für multiples Testen korrigiert, da deutlich weniger Gene und Variablen untersucht wurden und es sich um eine explorative Untersuchung im Rahmen einer Pilotstudie handelte. Nachfolgende Untersuchungen mit einer größeren Anzahl an Probanden sind notwendig, um die Ergebnisse zu replizieren. Zukünftige Ergebnisse sollten dann auch für multiples Testen korrigiert werden.

5 Zusammenfassung

Mit dieser Studie sollte untersucht werden, ob ein Genexpressionsunterschied zwischen heterogenen erwachsenen ADHS-Patienten und gesunden Kontrollen besteht und eine Behandlung mit Methylphenidat kurz- oder langfristige Genexpressionsunterschiede hervorruft. Außerdem war von Interesse, ob ein sich ein möglicher Behandlungseffekt durch MPH zwischen ADHS- und Kontrollgruppe unterscheidet. Dazu wurde ein peripheres Zellmodell mit EBV-modifizierten Lymphoblasten von ADHS-Patienten und Kontrollen gewählt, deren RNA für die weiteren Versuche genutzt wurde. In Vorversuchen sollte die Verwendung von MPH für die Versuchsmodellbedingungen optimiert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand der Parameter Zellkonzentration und Zell-

größe kein zelltoxischer Effekt von MPH in Konzentrationen bis 100 ng/μl ermittelt werden. Die Proben zeigten durchschnittlich sehr gute RNA-Konzentrationen (354 ng/μL), eine gute RNA-Qualität und nur leichte Verunreinigungen.

Die hypothesenfreien Microarray-Untersuchung zeigte zum Zeitpunkt t4 und unter MPH-Behandlung 163 Gene an der Grenze zu statistischem Signifikanzniveau. Die aus den ersten 138 ($p < 0,00139$, korrigiert für multiples Testen $p = 0,06$) ausgewählten Genen *ATXN1*, *GLUT3*, *GUCY1B3*, *HEY1*, *MAP3K8* und *NAV2* zeigten in der anschließenden qRT-PCR außer bei *GUCY1B3* (zu allen Zeiten eine höhere Expression bei ADHS; p-Werte der aufsteigenden Zeitpunkte 0,002; 0,089; 0,027; 0,055 und 0,064) keine signifikanten Gruppenunterschiede zwischen ADHS-Probanden und Kontrollen.

Allerdings konnten bei *ATXN1*, *GLUT3*, *HEY1*, *MAP3K8* und *NAV2* statistisch relevante Behandlungseffekte durch MPH beobachtet werden. Sie unterschieden sich in beiden Gruppen. Kurzzeiteffekte (innerhalb 1 bzw. 6h) traten ausschließlich bei der ADHS-Gruppe, Langzeiteffekte (2 Wochen) nur bei Kontrollen auf. Bei ADHS-Zellen wurde zum Zeitpunkt t1 die Expression von *ATXN1* ($p = 0,012$) und *NAV2* ($p = 0,001$) unter MPH erhöht. Eine signifikant geringerer kurzfristiger Genexpressionsanstieg zeigte sich bei *MAP3K8* ($p = 0,005$). Im dynamischen Verlauf zeigte sich eine signifikante Genexpressionssteigerung innerhalb von einer Woche (t3) bei *ATXN1* ($p = 0,057$) und *HEY1* (0,042). Bei Kontrollzellen führte die MPH-Behandlung zu signifikanten Genexpressionsunterschieden zum Zeitpunkt t4 bei *GLUT3* ($p = 0,044$) und *MAP3K8* ($p = 0,005$) und im dynamischen Verlauf zu höheren Expressionsanstiegen innerhalb von zwei Wochen (t4) bei *GLUT3* ($p = 0,033$) und *MAP3K8* ($p = 0,005$).

Zumindest in dem untersuchten Gen *GUCY1B3* gibt es also Expressionsunterschiede zwischen ADHS- und Kontrollgruppe. Methylphenidat beeinflusst die Genexpression in peripheren Zellen, obwohl seine Hauptwirkung im zentralen Nervensystem erzielt wird. Ob es sich dabei um eine Wirkung oder Nebenwirkung handelt, bleibt offen. Es gibt sowohl lang- als auch kurzfristige Genexpressionsveränderungen, wobei die kurzfristigen bei ADHS, die langfristigen in der Kontrollgruppe detektiert wurden. Damit unterscheidet sich der Effekt von MPH auf die Genexpression peripherer Zellen zwischen

ADHS und Kontrollgruppe.

Die untersuchten Gene beeinflussen unterschiedliche Signalwege. Besonders hervorzuheben sind das Dopaminsystem, der Notch- und NO-Signalweg. Da die Genprodukte jeweils nur ein Element längerer Signalkaskaden darstellen und oft auch mit mehreren Wegen interagieren, ist es schwer, direkte und indirekte Wirkungen von MPH zu unterscheiden. Es gibt allerdings Hinweise, dass die untersuchten Gene sowie deren Veränderung durch MPH im präfrontalen Kortex, dem limbischen System, Basalganglien und Kleinhirnarealen und dem aufsteigenden retikulären aktivierenden System (ARAS) eine wichtige Rollen spielen. Dies äußert sich schon in der embryonalen Hirnentwicklung, neuronalen Differenzierung und Synapsenbildung und hat Einfluss auf Aufmerksamkeit, Gedächtnis, Lernen, motorische Kontrolle und Emotionen.

Diese Ergebnisse müssen nun in einer größeren Stichprobe validiert werden. Somit könnten einige Effekte, die hier als nominal bezeichnet wurden, in einer größeren Stichprobe signifikante Werte erreichen, während andere Unterschiede evtl. auch verschwinden könnten. Außerdem sollte berücksichtigt werden, dass nicht alle ADHS-Patienten auf eine Behandlung mit MPH ansprechen. Es ist also sinnvoll, eine Subgruppenanalyse zwischen MPH-Respondern und Non-Respondern durchzuführen.

In weiteren Untersuchungen ist es notwendig, Behandlungseffekte durch MPH in neuronalen Zelllinien zu untersuchen, da ADHS primär eine Störung des zentralen Nervensystems darstellt, welches auch therapeutisch von MPH angesteuert wird.

Anhang

RNA-Konzentrationen, Qualität und Reinheitswerte: Nano-Drop und Experion (Tabelle 11)

Sample	NanoDrop [ng/μl]	EXP [ng/μl]	Abwei- chung Na- noDrop EXP [ng/μl]	Abwei- chung [%]	260/ 280	260/ 230	Ratio [28S: 18S]	RQI
SK 15 0	527,4	580,96	53,56	10,16	2,08	2,19	1,62	9,90
SK 15 MPH 0	383,2	565,7	182,5	47,63	2,04	1,55	1,91	10,00
SK 15 1	109,8	71,62	-38,18	-34,77	2,08	0,7	0,01	10,00
SK 15 MPH 1	216,7	46,98	-169,72	-78,32	2,08	0,9	2,41	10,00
SK 15 2	66,7	54,63	-12,07	-18,10	2,09	0,7	1,77	10,00
SK 15 MPH 2	276,1	275,93	-0,17	-0,06	2,01	0,6	1,96	10,00
SK 15 3	193,4	230,34	36,94	19,10	2,16	0,7	1,65	9,90
SK 15 MPH 3	1121,6	792,91	-328,69	-29,31	2,01	2,14	1,66	9,90
SK 15 4	313,7	423,62	109,92	35,04	2,06	1,98	1,88	10,00
SK 15 MPH 4	272,9	605,94	333,04	122,04	2,07	1,47	1,55	9,80
SK 20 0	454,3	428,09	-26,21	-5,77	2,02	1,82	1,75	10,00
SK 20 MPH 0	951,7	928,96	-22,74	-2,39	2,11	2,24	1,99	10,00
SK 20 1	412,7	347,68	-65,02	-15,75	2,05	1,67	0,01	10,00
SK 20 MPH 1	213,9	204,69	-9,21	-4,31	2,08	1,34	2,10	10,00
SK 20 2	249,6	307,16	57,56	23,06	2,07	1,05	1,84	10,00
SK 20 MPH 2	398,6	466,95	68,35	17,15	2,04	1,09	2,02	10,00
SK 20 3	282,4	335,23	52,83	18,71	2,08	0,65	1,70	9,90
SK 20 MPH 3	1022,8	647,09	-375,71	-36,73	2,1	2,2	1,62	9,90
SK 20 4	342	434,11	92,11	26,93	2,06	1,7	1,73	10,00
SK 20 MPH 4	267,01	408,98	141,97	53,17	2,08	1,9	1,72	9,90
SK 30 0	211,6	215,53	3,93	1,86	2,08	1,35	1,56	9,80
SK 30 MPH 0	424	542,52	118,52	27,95	2,03	1,53	2,01	10,00
SK 30 1	313,5	272,89	-40,61	-12,95	2,06	1,65	0,00	10,00
SK 30 MPH 1	218,1	278,19	60,09	27,55	2,09	1,14	1,82	10,00
SK 30 2	197,4	259,22	61,82	31,32	2,06	1,38	1,77	10,00
SK 30 MPH 2	261,5	332,93	71,43	27,32	2,07	1,61	1,88	10,00
SK 30 3	334,4	301,5	-32,9	-9,84	2,08	0,62	1,75	10,00
SK 30 MPH 3	552,5	659,81	107,31	19,42	2,11	1,98	1,63	9,90
SK 30 4	346	264,84	-81,16	-23,46	2,06	2	1,77	10,00

SK 30 MPH 4	122,3	165,02	42,72	34,93	2,04	1,9	1,65	9,90
SK 35 0	330,3	246,89	-83,41	-25,25	2,03	1,63	1,85	10,00
SK 35 MPH 0	388,4	454,16	65,76	16,93	2,03	1,46	1,85	10,00
SK 35 1	278,7	260,12	-18,58	-6,67	2,07	1,51	0,00	10,00
SK 35 MPH 1	246,9	333,27	86,37	34,98	2,06	1,26	2,07	10,00
SK 35 2	140,9	142,85	1,95	1,38	2,08	0,81	1,90	10,00
SK 35 MPH 2	174,2	184,88	10,68	6,13	2,1	0,88	1,89	10,00
SK 35 3	306	331,02	25,02	8,18	2,07	1,11	1,86	10,00
SK 35 MPH 3	333,1	308,28	-24,82	-7,45	2,05	1,49	1,67	9,90
SK 35 4	255	242,95	-12,05	-4,73	2,09	1,77	1,94	10,00
SK 35 MPH 4	288,9	466,07	177,17	61,33	2,06	1,66	1,65	9,90
SK 36 0	461,5	417,94	-43,56	-9,44	2,02	1,89	1,71	9,90
SK 36 MPH 0	358	523,11	165,11	46,12	2,26	81,17	1,57	9,80
SK 36 1	246,2	193,89	-52,31	-21,25	2,01	0,81	0,00	10,00
SK 36 MPH 1	155,4	166,98	11,58	7,45	2,07	1,25	2,00	10,00
SK 36 2	336,7	449,41	112,71	33,47	2,05	2,08	1,70	9,90
SK 36 MPH 2	358,4	494,19	135,79	37,89	2,06	1,19	2,01	10,00
SK 36 3	314	361,8	47,8	15,22	2,07	1,65	1,64	9,90
SK 36 MPH 3	516,6	528,99	12,39	2,40	2,1	1,78	1,64	9,90
SK 36 4	244,2	226,53	-17,67	-7,24	2,1	1,43	1,68	9,90
SK 36 MPH 4	317	493,7	176,7	55,74	2,06	1,78	1,61	9,90
SK 37 0	636,3	663,76	27,46	4,32	2,07	1,84	1,60	9,90
SK 37 MPH 0	538,5	792,7	254,2	47,21	2,11	1,89	1,88	10,00
SK 37 1	145,6	158,05	12,45	8,55	2,09	1,02	0,02	10,00
SK 37 MPH 1	216,9	214,22	-2,68	-1,24	2,09	1,04	1,89	10,00
SK 37 2	176,7	175,59	-1,11	-0,63	2,08	0,72	1,96	10,00
SK 37 MPH 2	176,3	158,07	-18,23	-10,34	2,09	0,47	1,94	10,00
SK 37 3	269,8	268,92	-0,88	-0,33	2,08	1,38	1,78	10,00
SK 37 MPH 3	862,3	657,07	-205,23	-23,80	2,09	2,17	1,51	9,80
SK 37 4	258,3	275,63	17,33	6,71	2,07	1,89	1,98	10,00
SK 37 MPH 4	294,7	450,18	155,48	52,76	2,07	1,82	1,59	9,90
SK 42 0	403,1	413,24	10,14	2,52	2,04	1,9	1,55	9,80
SK 42 MPH 0	372,4	534,65	162,25	43,57	2,06	1,25	1,57	9,80
SK 42 1	239	201,29	-37,71	-15,78	2,09	0,9	0,00	10,00
SK 42 MPH 1	222,8	305,77	82,97	37,24	2,06	1,78	1,81	10,00
SK 42 2	327,6	382,77	55,17	16,84	2,06	1,2	1,59	9,90
SK 42 MPH 2	426,8	295,4	-131,4	-30,79	2,02	2,12	0,01	10,00
SK 42 3	318	379,95	61,95	19,48	2,05	2,12	1,70	9,90
SK 42 MPH 3	511,6	621,33	109,73	21,45	2,11	1,46	1,84	10,00
SK 42 4	299,9	255,45	-44,45	-14,82	2,06	1,96	1,92	10,00
SK 42 MPH 4	274,1	280,19	6,09	2,22	2,07	2,03	0,01	10,00

SK 47	0	517,1	527,91	10,81	2,09	2,07	1,87	1,60	9,90
SK 47 MPH 0		411,4	608,13	196,73	47,82	2,03	1,65	1,77	10,00
SK 47	1	197,9	178,1	-19,8	-10,01	2,09	1,4	0,00	10,00
SK 47 MPH 1		205,7	270,73	65,03	31,61	2,03	1,21	2,04	10,00
SK 47	2	132,6	133,86	1,26	0,95	2,09	0,9	1,77	10,00
SK 47 MPH 2		439,4	527,73	88,33	20,10	2,02	2,02	0,01	10,00
SK 47	3	181,8	187,48	5,68	3,12	2,09	1,47	2,11	10,00
SK 47 MPH 3		534,6	573,15	38,55	7,21	2,12	1,13	1,69	9,90
SK 47	4	246,6	375,61	129,01	52,32	2,09	1,93	1,89	10,00
SK 47 MPH 4		256,5	242,24	-14,26	-5,56	2,06	1,88	0,01	10,00
SK 50	0	322,2	322,3	0,1	0,03	2,06	1,91	1,49	9,80
SK 50 MPH 0		396,4	468,88	72,48	18,28	2,04	1,34	1,47	9,80
SK 50	1	177,8	133,86	-43,94	-24,71	2,09	1,26	0,01	10,00
SK 50 MPH 1		233,5	404,75	171,25	73,34	2,09	1,28	1,86	10,00
SK 50	2	131,7	171,26	39,56	30,04	2,06	1	1,69	9,90
SK 50 MPH 2		335,5	428,11	92,61	27,60	2,07	0,97	0,02	10,00
SK 50	3	288,9	286,12	-2,78	-0,96	2,08	1,14	1,75	10,00
SK 50 MPH 3		410,9	595,06	184,16	44,82	2	1,73	1,54	9,80
SK 50	4	272,6	269,33	-3,27	-1,20	2,07	1,98	1,75	10,00
SK 50 MPH 4		273,9	267,35	-6,55	-2,39	2,07	1,84	0,01	10,00
SK 52	0	448,5	454,85	6,35	1,42	2,02	1,94	1,71	9,90
SK 52 MPH 0		302,6	393,44	90,84	30,02	2,06	1,42	1,53	9,80
SK 52	1	417,7	280,94	-136,76	-32,74	2,03	1,64	0,00	10,00
SK 52 MPH 1		221,4	223,77	2,37	1,07	2,07	0,91	2,70	10,00
SK 52	2	43	41,05	-1,95	-4,53	2,09	0,38	1,80	10,00
SK 52 MPH 2		402,5	542,83	140,33	34,86	2,03	1,72	0,01	10,00
SK 52	3	295,1	273,48	-21,62	-7,33	2,06	1,26	1,67	9,90
SK 52 MPH 3		690	729,2	39,2	5,68	2,13	1,95	1,67	9,90
SK 52	4	261,3	270,77	9,47	3,62	2,08	1,3	1,91	10,00
SK 52 MPH 4		211,5	212,83	1,33	0,63	2,09	1,99	0,01	10,00
SK 53	0	476,2	396,09	-80,11	-16,82	2,03	1,89	1,56	9,80
SK 53 MPH 0		424,5	661,93	237,43	55,93	2,03	1,78	1,60	9,90
SK 53	1	278	252,21	-25,79	-9,28	2,09	1,83	0,00	10,00
SK 53 MPH 1		179,4	0	-179,4	-100,00	2,08	0,63	0,00	0,00
SK 53	2	218,6	297,67	79,07	36,17	2,07	1,61	1,73	10,00
SK 53 MPH 2		237,6	318,83	81,23	34,19	2,07	2,06	0,01	10,00
SK 53	3	326,1	348,98	22,88	7,02	2,08	1,31	1,80	10,00
SK 53 MPH 3		670,4	760,71	90,31	13,47	2,11	2,03	1,64	9,90
SK 53	4	272,9	298,92	26,02	9,53	2,07	1,53	1,83	10,00
SK 53 MPH 4		321,6	322,96	1,36	0,42	2,06	2,12	0,01	10,00
SK 55	0	0,4	16,76	16,36	4090,00	-9,24	0,01	0,28	2,70
SK 55 MPH 0		415,6	533,38	117,78	28,34	2,03	1,06	1,51	9,80

SK 55	1	255,5	214,89	-40,61	-15,89	2,08	1,75	0,01	10,00
SK 55 MPH 1		208,2	254,53	46,33	22,25	2,06	1,48	1,70	9,90
SK 55	2	258,7	329,96	71,26	27,55	2,09	1,02	1,94	10,00
SK 55 MPH 2		333,9	381,63	47,73	14,29	2,07	0,81	0,02	10,00
SK 55	3	304,3	297,96	-6,34	-2,08	2,08	0,88	1,87	10,00
SK 55 MPH 3		916,7	865,35	-51,35	-5,60	2,1	1,98	1,73	10,00
SK 55	4	299,6	390,16	90,56	30,23	2,07	1,68	1,93	10,00
SK 55 MPH 4		314,4	372,89	58,49	18,60	2,07	1,83	0,01	10,00
SK 58	0	460,7	709,32	248,62	53,97	2,02	1,69	1,74	10,00
SK 58 MPH 0		497,6	724,06	226,46	45,51	2,11	1,87	1,71	9,90
SK 58	1	277,2	339,67	62,47	22,54	2,06	1,72	1,56	9,80
SK 58 MPH 1		231,5	385,82	154,32	66,66	2,07	1,39	1,61	9,90
SK 58	2	241,5	230,22	-11,28	-4,67	2,07	1,07	1,68	9,90
SK 58 MPH 2		434,3	608,97	174,67	40,22	2,04	1,54	0,02	10,00
SK 58	3	265,6	265,57	-0,03	-0,01	2,07	0,81	1,57	9,80
SK 58 MPH 3		573,8	805,58	231,78	40,39	2,11	1,72	1,65	9,90
SK 58	4	287,1	426,8	139,7	48,66	2,06	1,7	1,54	9,80
SK 58 MPH 4		306,6	311,14	4,54	1,48	2,06	1,4	0,02	10,00
SK 90	0	396,8	591,77	194,97	49,14	2,04	1,89	1,91	10,00
SK 90 MPH 0		380,3	574,54	194,24	51,08	2,03	2,13	1,63	9,90
SK 90	1	236	230,26	-5,74	-2,43	2,08	1,16	1,69	9,90
SK 90 MPH 1		234,2	450,4	216,2	92,31	2,07	1,28	1,81	10,00
SK 90	2	107,2	96,05	-11,15	-10,40	2,07	0,54	2,00	10,00
SK 90 MPH 2		226,9	263,4	36,5	16,09	2,09	1,17	0,02	10,00
SK 90	3	273,7	273,48	-0,22	-0,08	2,08	0,98	1,53	9,80
SK 90 MPH 3		622,5	638,23	15,73	2,53	2,11	2,08	1,71	9,90
SK 90	4	154,1	303,96	149,86	97,25	2,09	1,72	1,68	9,90
SK 90 MPH 4		241,4	302,32	60,92	25,24	2,07	1,44	0,02	10,00
SK 122	0	451,9	638,15	186,25	41,21	2,04	1,91	1,71	9,90
SK 122 MPH 0		402	492,05	90,05	22,40	2,06	1,47	1,74	10,00
SK 122	1	214	257	43	20,09	2,08	1,28	1,59	9,80
SK 122 MPH 1		252,8	326,12	73,32	29,00	2,06	1,35	1,52	9,80
SK 122	2	138,4	119,2	-19,2	-13,87	2,09	0,94	1,88	10,00
SK 122 MPH 2		315,6	405,01	89,41	28,33	2,06	1,66	0,02	10,00
SK 122	3	230,5	240,7	10,2	4,43	2,07	1,87	1,45	9,80
SK 122 MPH 3		474,4	1003,4	529	111,51	2,02	1,38	1,77	10,00
SK 122	4	278,1	444,44	166,34	59,81	2,06	1,8	1,72	9,90
SK 122 MPH 4		258,7	334,2	75,5	29,18	2,08	1,82	0,01	10,00
SK 123	0	420,7	634,61	213,91	50,85	2,03	1,66	1,85	10,00
SK 123 MPH 0		413,3	414,75	1,45	0,35	2,03	1,53	1,71	9,90
SK 123	1	278,6	303,92	25,32	9,09	2,07	1,01	1,47	9,80
SK 123 MPH 1		168,2	225,93	57,73	34,32	2,07	1,04	1,90	10,00

SK 123	2	66,7	49,02	-17,68	-26,51	2,08	0,35	1,63	9,90
SK 123 MPH 2		305,6	420,23	114,63	37,51	2,06	0,95	0,02	10,00
SK 123	3	307,1	277,55	-29,55	-9,62	2,07	0,86	1,56	9,80
SK 123 MPH 3		838,1	416,06	-422,04	-50,36	2,1	2,05	1,69	9,90
SK 123	4	314,2	370,17	55,97	17,81	2,07	1,82	1,65	9,90
SK 123 MPH 4		246,8	257,47	10,67	4,32	2,08	1,58	0,02	10,00
SK 142	0	337,2	517,23	180,03	53,39	2,05	1,81	1,91	10,00
SK 142 MPH 0		335,4	394,75	59,35	17,70	2,05	1,55	1,78	10,00
SK 142	1	127,7	134,19	6,49	5,08	2,09	0,86	1,64	9,90
SK 142 MPH 1		173,3	278,06	104,76	60,45	2,09	1,32	1,58	9,80
SK 142	2	90,2	71,19	-19,01	-21,08	2,06	0,86	1,54	9,80
SK 142 MPH 2		167	195,29	28,29	16,94	2,09	1,09	0,02	10,00
SK 142	3	182,5	167,73	-14,77	-8,09	2,1	0,85	1,46	9,80
SK 142 MPH 3		355,7	599,88	244,18	68,65	2,04	1,84	1,54	9,80
SK 142	4	267	495,82	228,82	85,70	2,07	1,83	1,76	9,70
SK 142 MPH 4		284,3	295,12	10,82	3,81	2,06	1,81	0,02	10,00
AR 714	0	471,3	726,63	255,33	54,18	2,01	1,83	1,71	9,90
AR 714 MPH 0		475	571,62	96,62	20,34	2,03	1,9	1,71	9,90
AR 714	1	163,2	233,65	70,45	43,17	2,08	1,43	1,09	9,50
AR 714 MPH 1		159	278,09	119,09	74,90	2,09	0,89	1,53	9,80
AR 714	2	148,7	145,77	-2,93	-1,97	2,07	1,34	1,91	10,00
AR 714 MPH 2		407,9	244,92	-162,98	-39,96	2,03	2,06	0,02	10,00
AR 714	3	248,5	244,2	-4,3	-1,73	2,07	1,16	1,45	9,80
AR 714 MPH 3		673,6	820,37	146,77	21,79	2,1	2,1	1,66	9,90
AR 714	4	226,8	442,28	215,48	95,01	2,07	1,38	1,61	9,90
AR 714 MPH 4		255,9	224,66	-31,24	-12,21	2,07	1,87	0,01	10,00
Durchschnitt		327,23	374,71	47,48	16	2,07	1,48	1,39	9,94
Minimum		43	41,05	-422,04	-78,32	2	0,35	0	9,5
Maximum		1121,6	1003,4	529	122,04	2,26	2,24	2,7	10
Std-Abweichung		169,63	187,17	110,81	30,25	0,03	0,44	0,72	0,08

Tabelle 11: RNA-Messwerte

Gelelektrophoresebilder

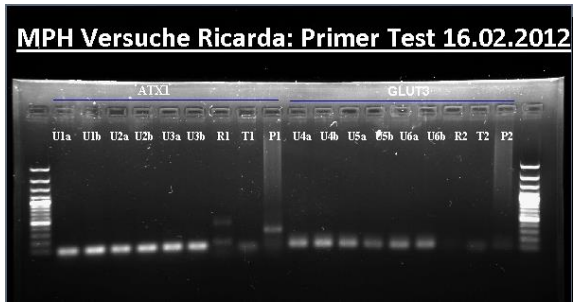


Abbildung 28: Primertest ATXN1, GLUT3

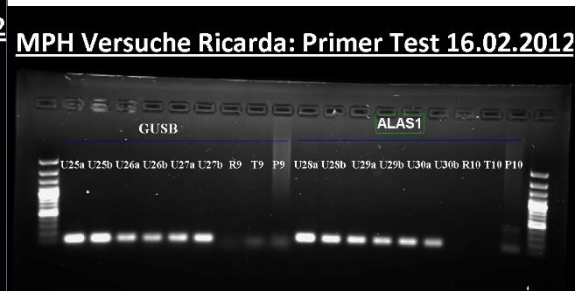


Abbildung 32: Primertest GUSB, ALAS1



Abbildung 29: Primertest HEY1, GUCY1B3

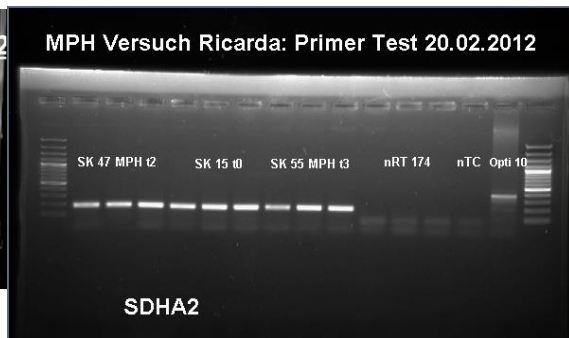


Abbildung 33: Primertest SDHA2



Abbildung 30: Primertest NAV2, B2M



Abbildung 34: Primertest HPRT1

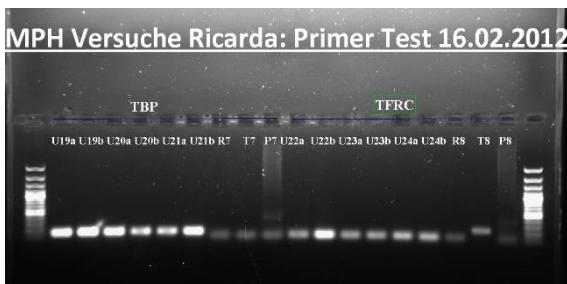


Abbildung 31: Primertest TBP, TFRC

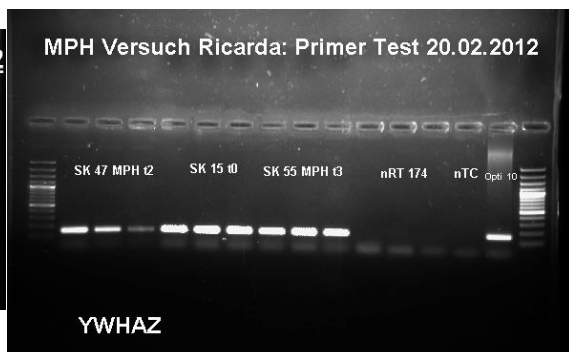


Abbildung 35: Primertest YWHAZ

Probandendaten

Tabelle 12: Demographische und phänotypische Daten der Probande

Code	Erkrankung	Geb	Geschlecht	Episode	Proben-entnahme	Psychia-tr. Medikamente	andere Medikamente	Raucher	Somat. Komorbidität	Psychiatrische Komorbidität	Drogen
SK035/1	ADHS	1967	f	depressive	17.12.2009	Mirtazapin	L-Thyroxin	-	Knotenstruma	Depression	
SK036/1	ADHS	1964	m	depressive	17.12.2009	Quetiapin, Venlafaxin, Maprotilin		-			
SK042/1	ADHS	1988	m		10,02.2010	Venlafaxin	Pramipexol 0,36mg	-		Depression	
SK047/1	ADHS	1984	f		23.02.2010			+	WPW-Syndrom, Asthma	Depression	Cannabis, Amphetamin
SK090/1	ADHS	1984	f	depressive	29.07.2010			+		Z.n. Polytoxikomanie und Psychose	Polytoxikomanie in der Vorgeschichte, Alkoholabhängigkeit
SK122/1	ADHS	1978	m	euthym	11,04.2011	Fluoxetin	MPH 20 mg	+	Wespennestallergie	Depression	Cannabis und Speed, zuletzt vor 2 Monaten
SK123/1	ADHS	1989	m	euthym	11,04.2011	Valproat	MPH ret. 40 mg	-			

SK132/ 1	ADHS	1987	f	de- pres- sive	13.05. 2011	Venlafaxin		+	Pol- lenal- lergie	Depres- sion	
SK037/ 1	ADS	1990	m		17.12. 2009	Venlafaxin		-			
AR714 PAAN	ADS										
SK015/ 1	Kon- trolle	1982	f		05.05. 2009		oreales Kontra- zepti- vum	-			
SK020/ 1	Kon- trolle	1981	m		18.06. 2009		Ceteri- zin	+			
SK030/ 1	Kon- trolle	1986	f		22.09. 2009		Diane 35	-			
SK050/ 1	Kon- trolle	1954	f		22.02. 2010 02.03. 10			-			
SK052/ 1	Kon- trolle	1954	m		02.03. 2010		Met- formin 2000 mg, Carve- dilol 25 mg, CoApro- vel 300mg, Victoza s.c.	-	Dia- betes melli- tus, art. Hy- per- tonie		
SK053/ 1	Kon- trolle	1991	f		02.03. 2010			-			
SK055/ 1	Kon- trolle	1975	f		02.03. 2010			-			
SK058/ 1	Kon- trolle	1980	f		04.03. 2010 09.09. 2010		L- Thyro- xin 25 µg	+			
SK112/ 1	Kon- trolle	1972	m		24.02. 2011 Lym-			-			

					phos					
SK141/ 1	Kon- trolle	1983	f		13.07. 2011		orales Kontra- zepti- vum	-	none	
SK142/ 1	Kon- trolle	1954	f		13.07. 2011		L- Thyro- xin	+	hypo- thy- reose	

Randomisierung der Proben

Tabelle 13: Randomisierung der Proben

rand	SK/AR	Code Nr.	MPH	T
1	SK	20		2
2	SK	47	MPH	2
3	SK	52	MPH	2
4	SK	35		3
5	SK	53	MPH	1
6	SK	53		4
7	SK	52		1
8	SK	37	MPH	2
9	SK	35	MPH	4
10	SK	20		0
11	SK	123		2
12	SK	50	MPH	1
13	AR	714		1
14	SK	30		4
15	SK	37	MPH	0
16	SK	35		2
17	SK	52	MPH	4
18	SK	53	MPH	0
19	SK	15	MPH	2
20	SK	36		0
21	SK	15	MPH	4
22	SK	90		3
23	SK	30		2
24	SK	30	MPH	2
25	SK	37		4
26	SK	20	MPH	4
27	SK	15		0
28	SK	52		3
29	SK	123	MPH	3
30	SK	58	MPH	2
31	SK	53		0
32	SK	35	MPH	0

110				
33	SK	142		3
34	SK	90		2
35	SK	36		1
36	SK	123		3
37	SK	36	MPH	3
38	SK	58		4
39	SK	122		4
40	SK	52		0
41	SK	15	MPH	0
42	SK	35	MPH	3
43	SK	55		4
44	SK	142	MPH	1
45	SK	58	MPH	0
46	AR	714		3
47	SK	55	MPH	1
48	SK	142	MPH	4
49	SK	47	MPH	0
50	SK	122	MPH	1
51	SK	42	MPH	3
52	SK	42		3
53	SK	55		0
54	SK	58		1
55	SK	123		1
56	SK	58		0
57	SK	52		4
58	SK	50		1
59	AR	714	MPH	3
60	SK	37		0
61	SK	15		4
62	SK	42		2
63	SK	123		4
64	SK	58		2
65	SK	42	MPH	4
66	SK	53	MPH	4
67	SK	55	MPH	0
68	SK	35		1

69	SK	20	MPH	0
70	SK	58	MPH	1
71	SK	52	MPH	0
72	SK	47		0
73	AR	714		2
74	SK	52	MPH	1
75	SK	90		0
76	SK	122		1
77	SK	123	MPH	2
78	SK	42		1
79	SK	47		1
80	SK	58	MPH	3
81	SK	122	MPH	2
82	SK	36	MPH	1
83	AR	714	MPH	1
84	SK	15	MPH	1
85	SK	52		2
86	SK	47	MPH	4
87	SK	37		1
88	AR	714	MPH	2
89	SK	42		0
90	SK	20	MPH	2
91	SK	55	MPH	2
92	SK	36	MPH	0
93	SK	122		0
94	SK	142		1
95	SK	42	MPH	0
96	SK	36		4
97	SK	53		3
98	SK	90	MPH	1
99	SK	37	MPH	3
100	SK	42	MPH	1
101	SK	36		3
102	SK	35		4
103	SK	55		1
104	AR	714		0

105	SK	30	MPH	0
106	SK	30	MPH	4
107	SK	47	MPH	1
108	SK	90		4
109	SK	53	MPH	2
110	SK	15		2
111	SK	53	MPH	3
112	SK	50		3
113	SK	142	MPH	2
114	SK	123	MPH	4
115	SK	50	MPH	2
116	SK	52	MPH	3
117	SK	30	MPH	3
118	SK	20		1
119	SK	58		3
120	SK	15	MPH	3
121	SK	42	MPH	2
122	SK	50	MPH	4
123	SK	122		2
124	SK	55		3
125	SK	35		0
126	AR	714		4
127	SK	47	MPH	3
128	SK	47		3
129	SK	36	MPH	4
130	SK	36	MPH	2
131	SK	58	MPH	4
132	SK	90	MPH	3
133	SK	90	MPH	0
134	SK	37		3
135	SK	122	MPH	3
136	SK	50		4
137	SK	142		0
138	SK	20	MPH	3
139	SK	50		0
140	SK	55		2

141	SK	53		1
142	SK	142	MPH	3
143	SK	122	MPH	0
144	SK	90	MPH	4
145	SK	30	MPH	1
146	SK	142		2
147	SK	90	MPH	2
148	SK	42		4
149	SK	122		3
150	AR	714	MPH	4
151	SK	50	MPH	3
152	SK	20		4
153	SK	122	MPH	4
154	SK	30		3
155	SK	47		4
156	SK	15		3
157	SK	35	MPH	1
158	SK	55	MPH	4
159	SK	37		2
160	SK	142	MPH	0
161	SK	123	MPH	1
162	SK	50		2
163	SK	90		1
164	SK	30		1
165	AR	714	MPH	0
166	SK	37	MPH	4
167	SK	35	MPH	2
168	SK	20		3
169	SK	123	MPH	0
170	SK	142		4
171	SK	30		0
172	SK	53		2
173	SK	36		2
174	SK	123		0
175	SK	50	MPH	0
176	SK	20	MPH	1

177	SK	37	MPH	1
178	SK	15		1
179	SK	47		2
180	SK	55	MPH	3

Plattenvorlagen

Tabelle 14: Plattenvorlage PCR: Platte 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	IRC 1
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	IRC 2
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	Opti 8
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	NRT 2
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	NRT 111
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	NTC

Tabelle 15: Plattenvorlage PCR: Platte 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	91	99	107	115	123	131	139	147	155	163	171	179
B	92	100	108	116	124	132	140	148	156	164	172	180
C	93	101	109	117	125	133	141	149	157	165	173	IRC 1
D	94	102	110	118	126	134	142	150	158	166	174	IRC 2
E	95	103	111	119	127	135	143	151	159	167	175	Opti 10
F	96	104	112	120	128	136	144	152	160	168	176	NRT 60
G	97	105	113	121	129	137	145	153	161	169	177	NRT 165
H	98	106	114	122	130	138	146	154	162	170	178	NTC

Plattenbelegung QRT PCR

Tabelle 16: Zielplatte 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
A	U-1	U-1	U-1	U-17	U-17	U-17	U-33	U-33	U-33	U-49	U-49	U-49	U-65	U-65	U-65	U-81	U-81	U-81
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK20t2	SK20t2	SK20t2	SK52MP Ht4	SK52MP Ht4	SK52MP Ht4	SK142t3	SK142t3	SK142t3	SK47MP Ht0	SK47MP Ht0	SK47MP Ht0	SK42MP Ht4	SK42MP Ht4	SK42MP Ht4	SK122M PHT2	SK122M PHT2	SK122M PHT2
B	U-9	U-9	U-9	U-25	U-25	U-25	U-41	U-41	U-41	U-57	U-57	U-57	U-73	U-73	U-73	U-89	U-89	U-89
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK35MP Ht4	SK35MP Ht4	SK35MP Ht4	SK37t4	SK37t4	SK37t4	SK15MP Ht0	SK15MP Ht0	SK15MP Ht0	SK52t4	SK52t4	SK52t4	AR714t2	AR714t2	AR714t2	SK42t0	SK42t0	SK42t0
C	U-2	U-2	U-2	U-18	U-18	U-18	U-34	U-34	U-34	U-50	U-50	U-50	U-66	U-66	U-66	U-82	U-82	U-82
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK47MP Ht2	SK47MP Ht2	SK47MP Ht2	SK53MP Ht0	SK53MP Ht0	SK53MP Ht0	SK90t2	SK90t2	SK90t2	SK122M PHT1	SK122M PHT1	SK122M PHT1	SK53MP Ht4	SK53MP Ht4	SK53MP Ht4	SK36MP Ht1	SK36MP Ht1	SK36MP Ht1
D	U-10	U-10	U-10	U-26	U-26	U-26	U-42	U-42	U-42	U-58	U-58	U-58	U-74	U-74	U-74	U-90	U-90	U-90
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK20t0	SK20t0	SK20t0	SK20MP Ht4	SK20MP Ht4	SK20MP Ht4	SK35MP Ht3	SK35MP Ht3	SK35MP Ht3	SK50t1	SK50t1	SK50t1	SK52MP Ht1	SK52MP Ht1	SK52MP Ht1	SK20MP Ht2	SK20MP Ht2	SK20MP Ht2
E	U-3	U-3	U-3	U-19	U-19	U-19	U-35	U-35	U-35	U-51	U-51	U-51	U-67	U-67	U-67	U-83	U-83	U-83
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK52MP Ht2	SK52MP Ht2	SK52MP Ht2	SK15MP Ht2	SK15MP Ht2	SK15MP Ht2	SK36t1	SK36t1	SK36t1	SK42MP Ht3	SK42MP Ht3	SK42MP Ht3	SK55MP Ht0	SK55MP Ht0	SK55MP Ht0	AR714M PHT1	AR714M PHT1	AR714M PHT1
F	U-11	U-11	U-11	U-27	U-27	U-27	U-43	U-43	U-43	U-59	U-59	U-59	U-75	U-75	U-75	P-1	P-1	P-1
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK123t 2	SK123t 2	SK123t 2	SK15t0	SK15t0	SK15t0	SK55t4	SK55t4	SK55t4	AR714M PHT3	AR714M PHT3	AR714M PHT3	SK90t0	SK90t0	SK90t0	IRC1	IRC1	IRC1
G	U-4	U-4	U-4	U-20	U-20	U-20	U-36	U-36	U-36	U-52	U-52	U-52	U-68	U-68	U-68	U-84	U-84	U-84
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK35t3	SK35t 3	SK35t3	SK36t0	SK36t0	SK36t0	SK123t3	SK123t3	SK123t3	SK42t3	SK42t3	SK42t3	SK35t1	SK35t1	SK35t1	SK15MP Ht1	SK15MP Ht1	SK15MP Ht1
H	U-12	U-12	U-12	U-28	U-28	U-28	U-44	U-44	U-44	U-60	U-60	U-60	U-76	U-76	U-76	P-2	P-2	P-2
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK50MP Ht1	SK50MP Ht1	SK50MP Ht1	SK52t3	SK52t3	SK52t3	SK142M PHT1	SK142M PHT1	SK142M PHT1	SK37t0	SK37t0	SK37t0	SK122t1	SK122t1	SK122t1	IRC2	IRC2	IRC2
I	U-5	U-5	U-5	U-21	U-21	U-21	U-37	U-37	U-37	U-53	U-53	U-53	U-69	U-69	U-69	U-85	U-85	U-85
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK53MP Ht1	SK53MP Ht1	SK53MP Ht1	SK15MP Ht4	SK15MP Ht4	SK15MP Ht4	SK36MP Ht3	SK36MP Ht3	SK36MP Ht3	SK55t0	SK55t0	SK55t0	SK20MP Ht0	SK20MP Ht0	SK20MP Ht0	SK52t2	SK52t2	SK52t2
J	U-13	U-13	U-13	U-29	U-29	U-29	U-45	U-45	U-45	U-61	U-61	U-61	U-77	U-77	U-77	P-3	P-3	P-3
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	AR714t 1	AR714t 1	AR714t 1	SK123M PHT3	SK123M PHT3	SK123M PHT3	SK58MP Ht0	SK58MP Ht0	SK58MP Ht0	SK15t4	SK15t4	SK15t4	SK123M PHT2	SK123M PHT2	SK123M PHT2	IRC3	IRC3	IRC3

K	U-6	U-6	U-6	U-22	U-22	U-22	U-38	U-38	U-38	U-54	U-54	U-54	U-70	U-70	U-70	U-86	U-86	U-86
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK53t4	SK53t4	SK53t4	SK90t3	SK90t3	SK90t3	SK58t4	SK58t4	SK58t4	SK58t1	SK58t1	SK58t1	SK58MP Ht1	SK58MP Ht1	SK58MP Ht1	SK47MP Ht4	SK47MP Ht4	SK47MP Ht4
L	U-14	U-14	U-14	U-30	U-30	U-30	U-46	U-46	U-46	U-62	U-62	U-62	U-78	U-78	U-78	R-1	R-1	R-1
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK30t4	SK30t4	SK30t4	SK58MP Ht2	SK58MP Ht2	SK58MP Ht2	AR714t3	AR714t3	AR714t3	SK42t2	SK42t2	SK42t2	SK42t1	SK42t1	SK42t1	nRT2	nRT2	nRT2
M	U-7	U-7	U-7	U-23	U-23	U-23	U-39	U-39	U-39	U-55	U-55	U-55	U-71	U-71	U-71	U-87	U-87	U-87
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK52t1	SK52t1	SK52t1	SK30t2	SK30t2	SK30t2	SK122t4	SK122t4	SK122t4	SK123t1	SK123t1	SK123t1	SK52MP Ht0	SK52MP Ht0	SK52MP Ht0	SK37t1	SK37t1	SK37t1
N	U-15	U-15	U-15	U-31	U-31	U-31	U-47	U-47	U-47	U-63	U-63	U-63	U-79	U-79	U-79	R-2	R-2	R-2
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK37MP Ht0	SK37MP Ht0	SK37MP Ht0	SK53t0	SK53t0	SK53t0	SK55MP Ht1	SK55MP Ht1	SK55MP Ht1	SK123t4	SK123t4	SK123t4	SK47t1	SK47t1	SK47t1	nRT111	nRT111	nRT111
O	U-8	U-8	U-8	U-24	U-24	U-24	U-40	U-40	U-40	U-56	U-56	U-56	U-72	U-72	U-72	U-88	U-88	U-88
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK37MP Ht2	SK37MP Ht2	SK37MP Ht2	SK30MP Ht2	SK30MP Ht2	SK30MP Ht2	SK52t0	SK52t0	SK52t0	SK58t0	SK58t0	SK58t0	SK47t0	SK47t0	SK47t0	AR714M PHT2	AR714M PHT2	AR714M PHT2
P	U-16	U-16	U-16	U-32	U-32	U-32	U-48	U-48	U-48	U-64	U-64	U-64	U-80	U-80	U-80	N-1	N-1	N-1
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK35t2	SK35t2	SK35t2	SK35MP Ht0	SK35MP Ht0	SK35MP Ht0	SK142M PHT4	SK142M PHT4	SK142M PHT4	SK58t2	SK58t2	SK58t2	SK58MP Ht3	SK58MP Ht3	SK58MP Ht3	nTC	nTC	nTC

Tabelle 17: Zielplatte 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
A	U-91	U-91	U-91	U-107	U-107	U-107	U-123	U-123	U-123	U-139	U-139	U-139	U-155	U-155	U-155	U-171	U-171	U-171
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK55MP Ht2	SK55MP Ht2	SK55MP Ht2	SK47MPH t1	SK47MPH t1	SK47MPH t1	SK122t2	SK122t2	SK122t2	SK50t0	SK50t0	SK50t0	SK47t4	SK47t4	SK47t4	SK30t0	SK30t0	SK30t0
B	U-99	U-99	U-99	U-115	U-115	U-115	U-131	U-131	U-131	U-147	U-147	U-147	U-163	U-163	U-163	U-179	U-179	U-179
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK37MP Ht3	SK37MP Ht3	SK37MP Ht3	SK50MPH t2	SK50MPH t2	SK50MPH t2	SK58MPH t4	SK58MPH t4	SK58MPH t4	SK90MPH t2	SK90MPH t2	SK90MPH t2	SK90t1	SK90t1	SK90t1	SK47t2	SK47t2	SK47t2
C	U-92	U-92	U-92	U-108	U-108	U-108	U-124	U-124	U-124	U-140	U-140	U-140	U-156	U-156	U-156	U-172	U-172	U-172
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK36MP Ht0	SK36MP Ht0	SK36MP Ht0	SK90t4	SK90t4	SK90t4	SK55t3	SK55t3	SK55t3	SK55t2	SK55t2	SK55t2	SK15t3	SK15t3	SK15t3	SK53t2	SK53t2	SK53t2
D	U-100	U-100	U-100	U-116	U-116	U-116	U-132	U-132	U-132	U-148	U-148	U-148	U-164	U-164	U-164	U-180	U-180	U-180
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK42MP Ht1	SK42MP Ht1	SK42MP Ht1	SK52MPH t3	SK52MPH t3	SK52MPH t3	SK90MPH t3	SK90MPH t3	SK90MPH t3	SK42t4	SK42t4	SK42t4	SK30t1	SK30t1	SK30t1	SK55MP Ht3	SK55MP Ht3	SK55MP Ht3
E	U-93	U-93	U-93	U-109	U-109	U-109	U-125	U-125	U-125	U-141	U-141	U-141	U-157	U-157	U-157	U-173	U-173	U-173
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK122t0	SK122t0	SK122t0	SK53MPH t2	SK53MPH t2	SK53MPH t2	SK35t0	SK35t0	SK35t0	SK53t1	SK53t1	SK53t1	SK35MPH t1	SK35MPH t1	SK35MPH t1	SK36t2	SK36t2	SK36t2
F	U-101	U-101	U-101	U-117	U-117	U-117	U-133	U-133	U-133	U-149	U-149	U-149	U-165	U-165	U-165	P-1	P-1	P-1
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK36t3	SK36t3	SK36t3	SK30MPH t3	SK30MPH t3	SK30MPH t3	SK90MPH t0	SK90MPH t0	SK90MPH t0	SK122t3	SK122t3	SK122t3	AR714MP Ht0	AR714MP Ht0	AR714MP Ht0	IRC1	IRC1	IRC1
G	U-94	U-94	U-94	U-110	U-110	U-110	U-126	U-126	U-126	U-142	U-142	U-142	U-158	U-158	U-158	U-174	U-174	U-174
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK142t1	SK142t1	SK142t1	SK15t2	SK15t2	SK15t2	AR714t4	AR714t4	AR714t4	SK142MP Ht3	SK142MP Ht3	SK142MP Ht3	SK55MPH t4	SK55MPH t4	SK55MPH t4	SK123t0	SK123t0	SK123t0
H	U-102	U-102	U-102	U-118	U-118	U-118	U-134	U-134	U-134	U-150	U-150	U-150	U-166	U-166	U-166	P-2	P-2	P-2
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK35t4	SK35t4	SK35t4	SK20t1	SK20t1	SK20t1	SK37t3	SK37t3	SK37t3	AR714MP Ht4	AR714MP Ht4	AR714MP Ht4	SK37MPH t4	SK37MPH t4	SK37MPH t4	IRC2	IRC2	IRC2
I	U-95	U-95	U-95	U-111	U-111	U-111	U-127	U-127	U-127	U-143	U-143	U-143	U-159	U-159	U-159	U-175	U-175	U-175
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK42MP Ht0	SK42MP Ht0	SK42MP Ht0	SK53MPH t3	SK53MPH t3	SK53MPH t3	SK47MPH t3	SK47MPH t3	SK47MPH t3	SK122MP Ht0	SK122MP Ht0	SK122MP Ht0	SK37t2	SK37t2	SK37t2	SK50MP Ht0	SK50MP Ht0	SK50MP Ht0
J	U-103	U-103	U-103	U-119	U-119	U-119	U-135	U-135	U-135	U-151	U-151	U-151	U-167	U-167	U-167	P-3	P-3	P-3
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK55t1	SK55t1	SK55t1	SK58t3	SK58t3	SK58t3	SK122MP Ht3	SK122MP Ht3	SK122MP Ht3	SK50MPH t3	SK50MPH t3	SK50MPH t3	SK35MPH t2	SK35MPH t2	SK35MPH t2	IRC3	IRC3	IRC3
K	U-96	U-96	U-96	U-112	U-112	U-112	U-128	U-128	U-128	U-144	U-144	U-144	U-160	U-160	U-160	U-176	U-176	U-176
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1

	SK36t4	SK36t4	SK36t4	SK50t3	SK50t3	SK50t3	SK47t3	SK47t3	SK47t3	SK90MPH t4	SK90MPH t4	SK90MPH t4	SK142MP Ht0	SK142MP Ht0	SK142MP Ht0	SK20MP Ht1	SK20MP Ht1	SK20MP Ht1
L	U-104	U-104	U-104	U-120	U-120	U-120	U-136	U-136	U-136	U-152	U-152	U-152	U-168	U-168	U-168	R-3	R-3	R-3
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	AR714t0	AR714t0	AR714t0	SK15MPH t3	SK15MPH t3	SK15MPH t3	SK50t4	SK50t4	SK50t4	SK20t4	SK20t4	SK20t4	SK20t3	SK20t3	SK20t3	nRT60	nRT60	nRT60
M	U-97	U-97	U-97	U-113	U-113	U-113	U-129	U-129	U-129	U-145	U-145	U-145	U-161	U-161	U-161	U-177	U-177	U-177
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK53t3	SK53t3	SK53t3	SK142MP Ht2	SK142MP Ht2	SK142MP Ht2	SK36MPH t4	SK36MPH t4	SK36MPH t4	SK30MPH t1	SK30MPH t1	SK30MPH t1	SK123MP Ht1	SK123MP Ht1	SK123MP Ht1	SK37MP Ht1	SK37MP Ht1	SK37MP Ht1
N	U-105	U-105	U-105	U-121	U-121	U-121	U-137	U-137	U-137	U-153	U-153	U-153	U-169	U-169	U-169	R-4	R-4	R-4
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK30MP Ht0	SK30MP Ht0	SK30MP Ht0	SK42MPH t2	SK42MPH t2	SK42MPH t2	SK142t0	SK142t0	SK142t0	SK122MP Ht4	SK122MP Ht4	SK122MP Ht4	SK123MP Ht0	SK123MP Ht0	SK123MP Ht0	nRT165	nRT165	nRT165
O	U-98	U-98	U-98	U-114	U-114	U-114	U-130	U-130	U-130	U-146	U-146	U-146	U-162	U-162	U-162	U-178	U-178	U-178
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK90MP Ht1	SK90MP Ht1	SK90MP Ht1	SK123MP Ht4	SK123MP Ht4	SK123MP Ht4	SK36MPH t2	SK36MPH t2	SK36MPH t2	SK142t2	SK142t2	SK142t2	SK50t2	SK50t2	SK50t2	SK15t1	SK15t1	SK15t1
P	U-106	U-106	U-106	U-122	U-122	U-122	U-138	U-138	U-138	U-154	U-154	U-154	U-170	U-170	U-170	T-1	T-1	T-1
	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1	ATXN1
	SK30MP Ht4	SK30MP Ht4	SK30MP Ht4	SK50MPH t4	SK50MPH t4	SK50MPH t4	SK20MPH t3	SK20MPH t3	SK20MPH t3	SK30t3	SK30t3	SK30t3	SK142t4	SK142t4	SK142t4	nTC	nTC	nTC

Statistische Auswertung

Tabelle 18: relative, normalisierte Genexpressionsdaten zu den einzelnen Zeitpunkten (tx) mit und ohne MPH

Deskriptive Statistik					
	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std. Abweichung
MPH_NAV_t0	9	,2003	1,2949	,616827	,4116542
MPH_NAV_t1	8	,4256	,9419	,617974	,1830153
MPH_NAV_t2	9	,0677	,7241	,376675	,1780270
MPH_NAV_t3	9	,4901	2,1777	,950405	,5395636
MPH_NAV_t4	9	,5640	2,4329	1,280760	,6786922
NAV_t0	9	,2933	,8908	,524687	,2036333
NAV_t1	9	,2614	,8065	,442148	,1680943
NAV_t2	9	,0579	,6183	,334679	,2099218
NAV_t3	9	,4486	1,9270	1,020733	,4494978
NAV_t4	9	,3578	2,1661	1,275447	,5588814
MPH_ATXN_t0	9	,0770	2,2205	1,503619	,6840295
MPH_ATXN_t1	9	1,2792	3,4178	2,123130	,7414875
MPH_ATXN_t2	9	1,1719	2,4789	1,600191	,4617544
MPH_ATXN_t3	9	,0866	2,7471	1,549846	1,0278429
MPH_ATXN_t4	9	1,1765	2,2223	1,806752	,3542551
ATXN_t0	9	,0176	2,4661	1,467472	,6961697
ATXN_t1	9	,1513	2,1252	1,156333	,6080087
ATXN_t2	9	,2237	1,8794	1,217779	,5982933
ATXN_t3	9	,0650	2,8370	1,595806	,9743474
ATXN_t4	9	,0401	3,4160	1,698193	1,1375275
MPH_HEY1_t0	8	,2927	1,0517	,587214	,2559213

MPH_HEY1_t1	9	,1674	1,4256	,796173	,4145832
MPH_HEY1_t2	8	,3327	1,0270	,679275	,2972143
MPH_HEY1_t3	6	,3902	1,7438	1,108286	,5429671
MPH_HEY1_t4	8	,3059	2,8150	1,234185	,8854961
HEY1_t0	8	,2545	,8802	,522846	,2411923
HEY1_t1	9	,3469	1,7725	,888351	,4440193
HEY1_t2	8	,1702	1,3372	,743195	,3981115
HEY1_t3	7	,5369	2,0192	1,153725	,5189462
HEY1_t4	8	,4808	2,0234	1,169796	,5894726
MPH_MAP3K8_t0	9	,9209	2,1043	1,539870	,3904927
MPH_MAP3K8_t1	9	1,3357	3,2674	2,123172	,6607298
MPH_MAP3K8_t2	9	1,2062	2,2785	1,546130	,3708643
MPH_MAP3K8_t3	9	1,2571	2,4103	1,822166	,3536551
MPH_MAP3K8_t4	9	1,4580	3,1279	2,285981	,6656133
MAP3K8_t0	9	,6736	2,2075	1,379107	,5046800
MAP3K8_t1	9	1,7707	3,5750	2,411518	,5260592
MAP3K8_t2	9	,1881	2,1914	1,569881	,5829324
MAP3K8_t3	9	1,1392	2,2597	1,737412	,3972076
MAP3K8_t4	9	1,3932	4,1212	2,104799	,8169217
MPH_SLC2A3_L_t0	9	,36601	1,02156	,6589322	,18869689
MPH_SLC2A3_L_t1	9	,51782	2,67721	1,1941178	,72678592
MPH_SLC2A3_L_t2	9	,24320	,74427	,4140489	,15726340
MPH_SLC2A3_L_t3	9	,34819	1,07960	,8210678	,23492817
MPH_SLC2A3_L_t4	9	,58164	1,61068	,8863089	,30261023
SLC2A3_L_t0	9	,19096	,99941	,5470844	,27940955
SLC2A3_L_t1	9	,41173	1,10921	,7013067	,20027175

SLC2A3_L_t2	9	,19757	,58900	,3526767	,13187088
SLC2A3_L_t3	9	,44793	1,25574	,7784167	,24949955
SLC2A3_L_t4	9	,28581	1,78393	,8401578	,44397829
MPH_GUCY1B3_t0	9	,1058	1,0837	,500012	,3746764
MPH_GUCY1B3_t1	8	,1348	1,3789	,498402	,4499939
MPH_GUCY1B3_t2	9	,0824	1,0787	,394605	,3285152
MPH_GUCY1B3_t3	9	,1245	1,7271	,611381	,5659604
MPH_GUCY1B3_t4	9	,1710	2,5238	,867910	,8195394
GUCY1B3_t0	9	,1093	1,1644	,387978	,3583181
GUCY1B3_t1	9	,1060	1,1277	,413916	,3427679
GUCY1B3_t2	9	,0677	1,1125	,402090	,3608361
GUCY1B3_t3	9	,1214	2,1209	,640878	,6633710
GUCY1B3_t4	9	,1121	2,8163	1,010508	,9521530
Valid N (listwise)	2				

Tabelle 19: Genexpressionsunterschiede zwischen MPH- und Vehikelbehandlung zu den einzelnen Zeitpunkten in der ADHS Gruppe

ADHS	Gepaarte Differenzen					T	df	Sig (2-seitig)
	Mittelwert	Std-abw.	Std.-fehler des Mittelwertes	95% Konfidenz-intervall der Differenz				
				Untere	Obere			
NAV_Effekt_t1 - MPH_NAV_Effekt_t1	-,08523	,37286	,13183	-,39695	,22649	-,647	7	,539
ATXN_Effekt_t1 - MPH_ATXN_Effekt_t1	-,93065	1,25612	,41871	-1,89619	,03489	-2,223	8	,057
HEY1_Effekt_t1 - MPH_HEY1_Effekt_t1	,06190	,34478	,13031	-,25696	,38077	,475	6	,652
MAP3K8_Effekt_t1 - MPH_MAP3K8_Effekt_t1	,44911	,69986	,23329	-,08885	,98707	1,925	8	,090
SLC2A3_Effekt_t1 - MPH_SLC2A3_Effekt_t1	-,35562	,72379	,24126	-,91198	,20073	-1,474	8	,179
GUCY1B3_Effekt_t1 - MPH_GUCY1B3_Effekt_t1	,03544	,39260	,13880	-,29278	,36366	,255	7	,806
NAV_Effekt_t2 - MPH_NAV_Effekt_t2	,05014	,45203	,15068	-,29732	,39761	,333	8	,748
ATXN_Effekt_t2 - MPH_ATXN_Effekt_t2	-,34627	1,32397	,44132	-1,36396	,67143	-,785	8	,455
HEY_Effekt_t2 - MPH_HEY_Effekt_t2	,08347	,20623	,09223	-,17260	,33954	,905	4	,417
MAP3K8_Effekt_t2 - MPH_MAP3K8_Effekt_t2	,18451	,95394	,31798	-,54875	,91778	,580	8	,578
SLC2A3_Effekt_t2 - MPH_SLC2A3_Effekt_t2	,03805	,38057	,12686	-,25448	,33058	,300	8	,772
GUCY1B3_Effekt_t2 - MPH_GUCY1B3_Effekt_t2	,11952	,30177	,10059	-,11244	,35148	1,188	8	,269
NAV_Effekt_t3 - MPH_NAV_Effekt_t3	,16247	,63330	,21110	-,32433	,64926	,770	8	,464
ATXN_Effekt_t3 - MPH_ATXN_Effekt_t3	,08211	1,65253	,55084	-1,18814	1,35235	,149	8	,885
HEY_Effekt_t3 - MPH_HEY_Effekt_t3	,05839	,22602	,11301	-,30125	,41803	,517	3	,641
MAP3K8_Effekt_t3 - MPH_MAP3K8_Effekt_t3	,07601	,61137	,20379	-,39393	,54595	,373	8	,719
SLC2A3_Effekt_t3 - MPH_SLC2A3_Effekt_t3	,04008	1,45003	,48334	-1,07452	1,15467	,083	8	,936
GUCY1B3_Effekt_t3 - MPH_GUCY1B3_Effekt_t3	,14153	,32601	,10867	-,10906	,39213	1,302	8	,229
NAV_Effekt_t4 - MPH_NAV_Effekt_t4	,08683	,67849	,22616	-,43471	,60836	,384	8	,711

ATXN_Effekt_t4 - MPH_ATXN_Effekt_t4	-,07241	1,68860	,56287	-1,37038	1,22556	-,129	8	,901
HEY_Effekt_t4 - MPH_HEY_Effekt_t4	-,13072	1,00933	,45139	-1,38396	1,12253	-,290	4	,787
MAP3K8_Effekt_t4 - MPH_MAP3K8_Effekt_t4	-,02042	1,05234	,35078	-,82932	,78848	-,058	8	,955
SLC2A3_Effekt_t4 - MPH_SLC2A3_Effekt_t4	-,15145	1,33645	,44548	-1,17874	,87584	-,340	8	,743
GUCY1B3_Effekt_t4 - MPH_GUCY1B3_Effekt_t4	,25463	,44445	,14815	-,08700	,59627	1,719	8	,124

Dargestellt sind die Genexpressionsdifferenzen zwischen MPH-behandelten und unbehandelten Zellen zu den einzelnen Zeitpunkten aus der ADHS-Gruppe. Grau hinterlegt sind die Unterschiede, die ein statistisches Signifikanzniveau erreichten.

Tabelle 20: Genexpressionsunterschiede zwischen MPH- und Vehikelbehandlung zu den einzelnen Zeitpunkten in der Kontrollgruppe

Kontrollen	Gepaarte Differenzen					T	df	Sig (2- seitig)
	Mittelwert	Std-abw.	Std.-fehler des Mittelwertes	95% Konfidenz-intervall der Differenz				
				Untere	Obere			
NAV_Effekt_t1 - MPH_NAV_Effekt_t1	-,01076	,36891	,13043	-,31917	,29766	-,082	7	,937
ATXN_Effekt_t1 - MPH_ATXN_Effekt_t1	,14333	1,14946	,43446	-,91975	1,20640	,330	6	,753
HEY1_Effekt_t1 - MPH_HEY1_Effekt_t1	,01394	,41931	,15848	-,37386	,40173	,088	6	,933
MAP3K8_Effekt_t1 - MPH_MAP3K8_Effekt_t1	,27237	,90948	,32155	-,48798	1,03272	,847	7	,425
SLC2A3_Effekt_t1 - MPH_SLC2A3_Effekt_t1	,27298	1,45690	,51509	-,94502	1,49098	,530	7	,613
GUCY1B3_Effekt_t1 MPH_GUCY1B3_Effekt_t1	-,08635	,30739	,10868	-,34334	,17063	-,795	7	,453
NAV_Effekt_t2 - MPH_NAV_Effekt_t2	,13991	,35188	,12441	-,15428	,43409	1,125	7	,298
ATXN_Effekt_t2 - MPH_ATXN_Effekt_t2	,31038	1,09261	,38630	-,60307	1,22382	,803	7	,448
HEY_Effekt_t2 - MPH_HEY_Effekt_t2	-,08328	,29743	,11242	-,35835	,19180	-,741	6	,487
MAP3K8_Effekt_t2 - MPH_MAP3K8_Effekt_t2	,14478	,79591	,28140	-,52062	,81017	,514	7	,623
SLC2A3_Effekt_t2 - MPH_SLC2A3_Effekt_t2	,28417	1,25979	,44540	-,76904	1,33738	,638	7	,544
GUCY1B3_Effekt_t2 MPH_GUCY1B3_Effekt_t2	-,18220	,55882	,19757	-,64938	,28499	-,922	7	,387
NAV_Effekt_t3 - MPH_NAV_Effekt_t3	-,08482	,49867	,17631	-,50172	,33208	-,481	7	,645
ATXN_Effekt_t3 - MPH_ATXN_Effekt_t3	-,65671	,81066	,28661	-1,33444	,02101	-2,291	7	,056
HEY_Effekt_t3 - MPH_HEY_Effekt_t3	-,37052	,33304	,13596	-,72003	-,02102	-2,725	5	,042
MAP3K8_Effekt_t3 - MPH_MAP3K8_Effekt_t3	-,13394	,60076	,21240	-,63618	,36830	-,631	7	,548
SLC2A3_Effekt_t3 - MPH_SLC2A3_Effekt_t3	-,05200	1,37183	,48501	-1,19887	1,09488	-,107	7	,918
GUCY1B3_Effekt_t3 MPH_GUCY1B3_Effekt_t3	-,11616	,46398	,16404	-,50405	,27174	-,708	7	,502

NAV_Effekt_t4 - MPH_NAV_Effekt_t4	,14187	,38513	,13616	-,18010	,46385	1,042	7	,332
ATXN_Effekt_t4 - MPH_ATXN_Effekt_t4	,52336	1,87581	,66320	-1,04486	2,09158	,789	7	,456
HEY_Effekt_t4 - MPH_HEY_Effekt_t4	,27095	,75433	,33735	-,66567	1,20758	,803	4	,467
MAP3K8_Effekt_t4 - MPH_MAP3K8_Effekt_t4	-,55019	,38560	,13633	-,87256	-,22782	-4,036	7	,005
SLC2A3_Effekt_t4 - MPH_SLC2A3_Effekt_t4	,32892	2,11361	,74727	-1,43810	2,09595	,440	7	,673
GUCY1B3_Effekt_t4 MPH_GUCY1B3_Effekt_t4	-,10970	,44923	,15883	-,48526	,26587	-,691	7	,512

Dargestellt sind die Genexpressionsdifferenzen zwischen MPH-behandelten und unbehandelten Zellen zu den einzelnen Zeitpunkten aus der Kontroll-Gruppe. Grau hinterlegt sind die Unterschiede, die ein statistisches Signifikanzniveau erreichten.

Literaturverzeichnis

- Abdul Muneer, P. M., Saleena Alikunju, Adam M. Szlachetka, and James Haorah
2011 Methamphetamine Inhibits the Glucose Uptake by Human Neurons and Astrocytes: Stabilization by Acetyl-L-Carnitine. *PLoS ONE* 6(4): e19258.
- Aktories, Klaus, Ulrich Förstermann, Franz Bernhard Hofmann, and Klaus Starke
2009 Allgemeine Und Spezielle Pharmakologie Und Toxikologie: Begründet von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel - Mit Zugang Zum Elsevier-Portal. 10th edition. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
- Allroggen, Marc, Udvardi, Patrick, Plener, Paul, et al.
2010 Langzeiteffekte von Psychostimulanzien - Welche Auswirkungen Sind Uns Aus Prä-/klinischen Studien Bekannt? 17(3). Schwerpunkt Kinder- Und Jugendpsychiatrie: 125–132.
- Amersahn Biosciences
2001 Ficoll PM 70, Ficoll PM 400, Cell Separation. Data file 18-1158-27 AA, Amersham.
- Arzneimittel-Richtlinie/ Anlage III: Nummer 44 - Stimulantien. Gemeinsamer Bundesausschuss (GBE): www.g-ba.de Abruf: 15.10.2015
- Ashare, Rebecca L., Larry W. Hawk, Keri Shiels, et al.
2010 Methylphenidate Enhances Prepulse Inhibition During Processing of Task-Relevant Stimuli in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Psychophysiology* 47(5): 838–845.
- Balashova, Nataliya, Fu-Jung Chang, Maria Lamothe, Qian Sun, and Annie Beuve
2005 Characterization of a Novel Type of Endogenous Activator of Soluble Guanylyl Cyclase. *The Journal of Biological Chemistry* 280(3): 2186–2196.
- Bannon, M J, S K Michelhaugh, J Wang, and P Sacchetti
2001 The Human Dopamine Transporter Gene: Gene Organization, Transcriptional Regulation, and Potential Involvement in Neuropsychiatric Disorders. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 11(6): 449–455.
- Barøy, Tuva, Dorian Misceo, Petter Strømme, et al.
2013 Haploinsufficiency of Two Histone Modifier Genes on 6p22.3, ATXN1 and JARID2, Is Associated with Intellectual Disability. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8(1): 3.
- Barr, Alasdair M, William J Panenka, G William MacEwan, et al.
2006 The Need for Speed: An Update on Methamphetamine Addiction. *Journal of Psychiatry & Neuroscience: JPN* 31(5): 301–313.

Bell, Richard L, Mark W Kimpel, Jeanette N McClintick, et al.

2009 Gene Expression Changes in the Nucleus Accumbens of Alcohol-Preferring Rats Following Chronic Ethanol Consumption. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 94(1): 131–147.

Bio-Rad, Life-Science Group

2009 iQTM SYBR Green Supermix - Instruction Manual. Instruction Manual.

2013 ChemiDoc TM XRS+ Imager Bulletin 5837 Pev E. www.bio-rad.com.

http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5837E.pdf, accessed May 7, 2013.

N.d. iScript TM cDNA Synthesis Kit. Hercules, CA. <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4106228C.pdf>, accessed May 8, 2013.

Björklund, Anders, and Stephen B Dunnett

2007 Dopamine Neuron Systems in the Brain: An Update. *Trends in Neurosciences* 30(5): 194–202.

Boxberger, Hans Jürgen

2007 Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur: Einführung in Grundlagen und Techniken. Weinheim: Wiley-VCH.

Brookes, Keeley J, Benjamin M Neale, Karen Sugden, et al.

2007 Relationship between VNTR Polymorphisms of the Human Dopamine Transporter Gene and Expression in Post-Mortem Midbrain Tissue. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 144B(8): 1070–1078.

Brown, Thomas E

2009 ADHD Comorbidities: Handbook for ADHD Complications in Children and Adults. Washington, DC: American Psychiatric Pub.

Calipari, Erin S, and Sara R Jones

2014 Sensitized Nucleus Accumbens Dopamine Terminal Responses to Methylphenidate and Dopamine Transporter Releasers after Intermittent-Access Self-Administration. *Neuropharmacology* 82C: 1–10,

Carter, M.M., V.E. Walker, C.L. Mc Cash, and D.M. Walker

2006 Cytotoxicity and Mutagenicity in Human TK6 Cells Exposed in Vitro to Methylphenidate. *The Toxicologist* 90(1): 26.

Celestino-Soper, Patrícia BS, Cindy Skinner, Richard Schroer, et al.

2012 Deletions in Chromosome 6p22. 3-p24. 3, Including ATXN1, Are Associated with Developmental Delay and Autism Spectrum Disorders. *Mol Cytogenet* 5: 5–17.

- Challman, Thomas D., and James J. Lipsky
2000 Methylphenidate: Its Pharmacology and Uses. *Mayo Clinic Proceedings* 75(7): 711–721,
- Chang, Alex C Y, YangXin Fu, Victoria C Garside, et al.
2011 Notch Initiates the Endothelial-to-Mesenchymal Transition in the Atrioventricular Canal through Autocrine Activation of Soluble Guanylyl Cyclase. *Developmental Cell* 21(2): 288–300,
- Chen, Kuang-Den, Po-Tsung Chang, Yueh-Hsin Ping, et al.
2011 Gene Expression Profiling of Peripheral Blood Leukocytes Identifies and Validates ABCB1 as a Novel Biomarker for Alzheimer’s Disease. *Neurobiology of Disease* 43(3): 698–705.
- Conners, C. K., D. Erhardt, J. N. Epstein, et al.
1999 Self-Ratings of ADHD Symptoms in Adults I: Factor Structure and Normative Data. *Journal of Attention Disorders* 3(3): 141–151,
- Contini, Verônica, Diego L Rovaris, Marcelo M Victor, et al.
2012 Pharmacogenetics of Response to Methylphenidate in Adult Patients with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): A Systematic Review. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*.
- Crespo-Barreto, Juan, John D Fryer, Chad A Shaw, Harry T Orr, and Huda Y Zoghbi
2010 Partial Loss of Ataxin-1 Function Contributes to Transcriptional Dysregulation in Spinocerebellar Ataxia Type 1 Pathogenesis. *PLoS Genetics* 6(7): e1001021,
- Debey-Pascher, Svenja, Jing Chen, Thorsten Voss, and Andrea Staratschek-Jox
2012 Blood-Based miRNA Preparation for Noninvasive Biomarker Development. *In Next-Generation MicroRNA Expression Profiling Technology* Pp. 307–338. Springer. http://link.springer.com/protocol/10,1007/978-1-61779-427-8_22, accessed May 7, 2013.
- Denisov, Vladimir, William Strong, Mark Walder, Jeff Gingrich, and Henri Wintz
2008 Development and Validation of RQI: An RNA Quality Indicator for the Experion Automated Electrophoresis System. *Bio-Rad Bulletin* 5761, <http://www.gene-quantification.org/Bio-Rad-bulletin-5761.pdf>, accessed April 4, 2013.

Derbyshire, Emily R., and Michael A. Marletta
2009 Biochemistry of Soluble Guanylate Cyclase. *In* cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications. Harald H. H. W. Schmidt, Franz Hofmann, and Johannes-Peter Stasch, eds. Pp. 17–31, Handbook of Experimental Pharmacology, 191, Springer Berlin Heidelberg. http://link.springer.com/chapter/10,1007/978-3-540-68964-5_2, accessed March 27, 2014.

Dreischer, Christian
N.d. DNA, ChIP-Chip Und Protein-Microarrays. Eberhard Karls Universität Tübingen

EasyXpress Protein Synthesis Mega, EasyXpress NMR Protein Synthesis Kits, and EasyXpress NMR Uniform Labeling Kits
N.d. EasyXpress® Large-Scale Synthesis Handbook.
<http://207.154.21.37/uploads/File/CIL-Qiagen-prf3.pdf>, accessed May 7, 2013.

Ehret, Georg B., Patricia B. Munroe, Kenneth M. Rice, et al.
2011 Genetic Variants in Novel Pathways Influence Blood Pressure and Cardiovascular Disease Risk. *Nature* 478(7367): 103–109.

El-Zein, Randa A., Sherif Z. Abdel-Rahman, Matthew J. Hay, et al.
2005 Cytogenetic Effects in Children Treated with Methylphenidate. *Cancer Letters* 230(2): 284–291,

Fosi, Tanguu, Maria T Lax-Pericall, Rod C Scott, Brian G Neville, and Sarah E Aylett
2013 Methylphenidate Treatment of Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Young People with Learning Disability and Difficult-to-Treat Epilepsy: Evidence of Clinical Benefit. *Epilepsia* 54(12): 2071–2081,

Franke, B, S V Faraone, P Asherson, et al.
2012 The Genetics of Attention Deficit/hyperactivity Disorder in Adults, a Review. *Molecular Psychiatry* 17(10): 960–987.

Franke, Barbara, Benjamin M. Neale, and Stephen V. Faraone
2009 Genome-Wide Association Studies in ADHD. *Human Genetics* 126(1): 13–50,

Freudenberg F, Althoa A, Reif A
2015 Neuronal nitric oxide synthase (NOS1) and its adaptor, NOS1AP, as a genetic risk factor for psychiatric disorders. *Genes Brain Behaviour* 14 (1): 46-63.

Fuke, Satoshi, Natsumi Minami, Hiroki Kokubo, et al.
2006 Hesr1 Knockout Mice Exhibit Behavioral Alterations through the Dopaminergic Nervous System. *Journal of Neuroscience Research* 84(7): 1555–1563.

Fuke, Satoshi, Noboru Sasagawa, and Shoichi Ishiura

2005 Identification and Characterization of the Hesr1/Hey1 as a Candidate Trans-Acting Factor on Gene Expression through the 3' Non-Coding Polymorphic Region of the Human Dopamine Transporter (DAT1) Gene. *Journal of Biochemistry* 137(2): 205–216.

Ghahramani Seno, Mohammad M., Pingzhao Hu, Fuad G. Gwadry, et al.
2011 Gene and miRNA Expression Profiles in Autism Spectrum Disorders. *Brain Research* 1380: 85–97.

Gill, Kathryn E, Peter J Pierre, James Daunais, et al.
2012 Chronic Treatment with Extended Release Methylphenidate Does Not Alter Dopamine Systems or Increase Vulnerability for Cocaine Self-Administration: A Study in Nonhuman Primates. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 37(12): 2555–2565.

Greiner Bio One
2007 Leucosep. Gebrauchsanleitung, Deutschland. www.gbo.com/bioscience.

Hahn, Helmut
2009 *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie: mit 157 Tabellen*. Heidelberg: Springer.

Hallén, K, C Olgart, L E Gustafsson, and N P Wiklund
2001 Modulation of Neuronal Nitric Oxide Release by Soluble Guanylyl Cyclase in Guinea Pig Colon. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280(4): 1130–1134.

Hanafy, Khalid A, Emil Martin, and Ferid Murad
2004 CCTeta, a Novel Soluble Guanylyl Cyclase-Interacting Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 279(45): 46946–46953.

Hawi, Z, L Kent, M Hill, et al.
2010 ADHD and DAT1: Further Evidence of Paternal over-Transmission of Risk Alleles and Haplotype. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 153B(1): 97–102.

Hearst, Scoty M., Mariper E. Lopez, Qingmei Shao, Yong Liu, and Parminder JS Vig
2010 Dopamine D2 Receptor Signaling Modulates Mutant Ataxin-1 S776 Phosphorylation and Aggregation. *Journal of Neurochemistry* 114(3): 706–716.

Hoffmann, Heinrich
1933 *Der Struwwelpeter: Oder lustige Geschichten und drollige Bilder*. Auflage: 12. Frankfurt am Main: Insel Verlag.

Home - Gene - NCBI

N.d. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>, accessed May 11, 2014.

Hooper, Claudie, Mahvash Tavassoli, J Paul Chapple, et al.

2006 TAp73 Isoforms Antagonize Notch Signalling in SH-SY5Y Neuroblastomas and in Primary Neurones. *Journal of Neurochemistry* 99(3): 989–999.

Hoogman, Martine et al.

2010 Nitric Oxide Synthase Genotype Modulation of Impulsivity and Ventral Striatal Activity in Adult ADHD Patients and Healthy Comparison Subjects. *The American Journal of Psychiatry*, Vol. 168 (10), 1099-1106

Huang, Qihong, Angel Raya, Paul DeJesus, et al.

2004 Identification of p53 Regulators by Genome-Wide Functional Analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(10): 3456–3461,

Ibrahim, Mohammed, Emily R. Derbyshire, Alexandra V. Soldatova, Michael A. Marletta, and Thomas G. Spiro

2010 Soluble Guanylate Cyclase Is Activated Differently by Excess NO and by YC-1: Resonance Raman Spectroscopic Evidence. *Biochemistry* 49(23): 4864–4871,

Im, Sang-Hee, Eun Sook Park, Deog Young Kim, Dong Ho Song, and Jong Doo Lee

2007 The Neuroradiological Findings of Children with Developmental Language Disorder. *Yonsei Medical Journal* 48(3): 405–411,

Ishibashi, M, K Moriyoshi, Y Sasai, et al.

1994 Persistent Expression of Helix-Loop-Helix Factor HES-1 Prevents Mammalian Neural Differentiation in the Central Nervous System. *The EMBO Journal* 13(8): 1799–1805.

Iso, Tatsuya, Larry Kedes, and Yasuo Hamamori

2003 HES and HERP Families: Multiple Effectors of the Notch Signaling Pathway. *Journal of Cellular Physiology* 194(3): 237–255.

Issy, A C, C Salum, and E A Del Bel

2009 Nitric Oxide Modulation of Methylphenidate-Induced Disruption of Prepulse Inhibition in Swiss Mice. *Behavioural Brain Research* 205(2): 475–481

Joober, Ridha, Natalie Grizenko, Sarojini Sengupta, et al.

2007 Dopamine Transporter 3'-UTR VNTR Genotype and ADHD: A Pharmacobehavioural Genetic Study with Methylphenidate. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 32(6): 1370–1376.

- Joppien, Saskia, Sarah Lena Maier, and Danielle Wendling
2010 BASICS Experimentelle Doktorarbeit. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
- Kaelin, D L, D X Cifu, and B Matthies
1996 Methylphenidate Effect on Attention Deficit in the Acutely Brain-Injured Adult. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 77(1): 6–9.
- Kanno, Kouta, and Shoichi Ishiura
2011 Differential Effects of the HESR/HEY Transcription Factor Family on Dopamine Transporter Reporter Gene Expression via Variable Number of Tandem Repeats. *Journal of Neuroscience Research* 89(4): 562–575.
- Katidou, Markella, Nektarios Tavernarakis, and Domna Karagogeos
2013 The Contactin RIG-6 Mediates Neuronal and Non-Neuronal Cell Migration in *Caenorhabditis Elegans*. *Developmental Biology* 373(1): 184–195.
- Kim, Yong Wook, Ji-Cheol Shin, and Young-sil An
2009 Effects of Methylphenidate on Cerebral Glucose Metabolism in Patients with Impaired Consciousness after Acquired Brain Injury. *Clinical Neuropharmacology* 32(6): 335–339.
- Kish, Stephen J.
2008 Pharmacologic Mechanisms of Crystal Meth. *Canadian Medical Association Journal* 178(13): 1679–1682.
- Kleppisch, Thomas, and Robert Feil
2009 cGMP Signalling in the Mammalian Brain: Role in Synaptic Plasticity and Behaviour. *Handbook of Experimental Pharmacology*(191): 549–579.
- Kooij, J Sandra, A Marije Boonstra, Sita H Vermeulen, et al.
2008 Response to Methylphenidate in Adults with ADHD Is Associated with a Polymorphism in SLC6A3 (DAT1). *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 147B(2): 201–208.
- Lesch, Klaus Peter, S. Selch, T. J. Renner, et al.
2010 Genome-Wide Copy Number Variation Analysis in Attention-Deficit/hyperactivity Disorder: Association with Neuropeptide Y Gene Dosage in an Extended Pedigree. *Molecular Psychiatry* 16(5): 491–503.
- Levant, Beth, Troy J. Zarcone, Paul F. Davis, Marlies K. Ozias, and Stephen C. Fowler
2011 Differences in Methylphenidate Dose Response between Periadolescent and Adult Rats in the Familiar Arena-Novel Alcove Task. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 337(1): 83–91,

Life Science Group

N.d. CFX96TM and CFX384TM Real-Time PCR Detection Systems - Instruction Manual. Chicago. http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_10010424.pdf, accessed October 16, 2008.

Lindl, Toni, and Gerhard Gstraunthaler

2008 Zell- und Gewebekultur: Von den Grundlagen zur Laborbank. Heidelberg, Neckar: Spektrum Akademischer Verlag.

Linszen, A M W, A Sambeth, E F P M Vuurman, and W J Riedel

2014 Cognitive Effects of Methylphenidate in Healthy Volunteers: A Review of Single Dose Studies. The International Journal of Neuropsychopharmacology / Official Scientific Journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP): 1–17.

Liu, Xiaoheng, Juan Yang, Ling Wang, et al.

2000 An Improvement on Sol-Gel Method for Preparing Ultrafine and Crystallized Titania Powder. Materials Science and Engineering: A 289(1): 241–245.

Luciano, Brenda S, Sang Hsu, Padma L Channavajhala, Lih-Ling Lin, and John W Cuozzo

2004 Phosphorylation of Threonine 290 in the Activation Loop of Tpl2/Cot Is Necessary but Not Sufficient for Kinase Activity. The Journal of Biological Chemistry 279(50): 52117–52123.

Ludolph, A. G., U. Schaz, A. Storch, et al.

2006 Methylphenidate Exerts No Neurotoxic, but Neuroprotective Effects in Vitro. Journal of Neural Transmission 113(12): 1927–1934.

Ma, Liang, Yan-Hui Chen, Hui Chen, Yan-Yan Liu, and Yan-Xia Wang

2011 The Function of Hypothalamus–pituitary–adrenal Axis in Children with ADHD. Brain Research 1368: 159–162.

Marchant, Barrie K, Frederick W Reimherr, Corinne Halls, Erika D Williams, and Robert E Strong

2010 OROS Methylphenidate in the Treatment of Adults with ADHD: A 6-Month, Open-Label, Follow-up Study. Annals of Clinical Psychiatry: Official Journal of the American Academy of Clinical Psychiatrists 22(3): 196–204.

Marcus-Gueret, Nancy, Kristopher L. Schmidt, and Eve G. Stringham

2011 Distinct Cell Guidance Pathways Controlled by the Rac and Rho GEF Domains of UNC-73/TRIO in Caenorhabditis Elegans. Genetics.
[http://www.genetics.org/content/early/2011/10/13/genetics.111,134429](http://www.genetics.org/content/early/2011/10/13/genetics.111.134429), accessed April 4, 2013.

Margraf, J.

1994 Diagnostisches Kurzinterview bei psychischen Störungen: Mini-DIPS. Berlin Heidelberg New York, Springer Verlag

Matilla, Antoni, Erik D. Roberson, Sandro Banfi, et al.

1998 Mice Lacking Ataxin-1 Display Learning Deficits and Decreased Hippocampal Paired-Pulse Facilitation. *The Journal of Neuroscience* 18(14): 5508–5516.

McNeill, Elizabeth M., Mariana Klöckner-Bormann, Elizabeth C. Roesler, et al.

2011 *Nav2* Hypomorphic Mutant Mice Are Ataxic and Exhibit Abnormalities in Cerebellar Development. *Developmental Biology* 353(2): 331–343.

McNeill, Elizabeth M., Kenneth P. Roos, Dieder Moechars, and Margaret Clagett-Dame

2010 *Nav2* Is Necessary for Cranial Nerve Development and Blood Pressure Regulation. *Neural Dev* 5(6). <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1749-8104-5-6.pdf>, accessed April 4, 2013.

Merrill, R A, L A Plum, M E Kaiser, and M Clagett-Dame

2002 A Mammalian Homolog of *Unc-53* Is Regulated by All-Trans Retinoic Acid in Neuroblastoma Cells and Embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(6): 3422–3427.

Michaelides, Michael, Javier Pascau, Juan-Domingo Gispert, et al.

2010 Dopamine D4 Receptors Modulate Brain Metabolic Activity in the Prefrontal Cortex and Cerebellum at Rest and in Response to Methylphenidate. *European Journal of Neuroscience* 32(4): 668–676.

Moszczyńska, Anna, Paul Fitzmaurice, Lee Ang, et al.

2004 Why Is Parkinsonism Not a Feature of Human Methamphetamine Users? *Brain: A Journal of Neurology* 127(Pt 2): 363–370,

Muley, P D, E M McNeill, M A Marzinke, et al.

2008 The atRA-Responsive Gene *Neuron Navigator 2* Functions in Neurite Outgrowth and Axonal Elongation. *Developmental Neurobiology* 68(13): 1441–1453.

Müller, Andreas, Gian Candrian, and Juri Kropotov

2011 Genetik Und Neurotransmitter. *In* ADHS – Neurodiagnostik in Der Praxis Pp. 81–89. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
http://link.springer.com/content/pdf/10,1007%2F978-3-642-20062-5_5, accessed April 4, 2013.

Mulligan, Megan K., Xusheng Wang, Adrienne L. Adler, et al.

2012 Complex Control of GABA (A) Receptor Subunit mRNA Expression: Variation, Covariation, and Genetic Regulation. *PloS One* 7(4): e34586.

Neugebauer, Julia

2007 Regulation von Apoptose Und Überleben Durch Signalwege von LMP1 Und TNF-Rezeptor 1, Text.PhDThesis, Imu. <http://edoc.ub.uni-muenchen.de/7974/>, accessed May 5, 2013.

Ohadi, Mina, Elham Shirazi, Mehdi Tehranidoosti, et al.

2006 Attention-Deficit/hyperactivity Disorder (ADHD) Association with the DAT1 Core Promoter- 67 T Allele. *Brain Research* 1101(1): 1–4.

Padala, Prasad R., Kalpana P. Padala, Dennis H. Sullivan, et al.

2012 Improvement of Glycemic Control Using Methylphenidate Treatment of Apathy: A Preliminary Report. *Journal of the American Geriatrics Society* 60(7): 1383–1384.

Pascoli, Vincent, Emmanuel Valjent, Anne-Gaëlle Corbillé, et al.

2005 cAMP and Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling in Response to D-Amphetamine and Methylphenidate in the Prefrontal Cortex in Vivo: Role of Beta 1-Adrenoceptors. *Molecular Pharmacology* 68(2): 421–429.

Paulsen, Friedrich, and Jens Waschke

N.d. Sobotta: Atlas Der Anatomie Des Menschen. 3 Bände Und Tabellenheft.

Peeters, Pieter J, Alexis Baker, Ilse Goris, et al.

2004 Sensory Deficits in Mice Hypomorphic for a Mammalian Homologue of Unc-53. *Brain Research. Developmental Brain Research* 150(2): 89–101,

Pelham, W E, E M Gnagy, L Burrows-Maclean, et al.

2001 Once-a-Day Concerta Methylphenidate versus Three-Times-Daily Methylphenidate in Laboratory and Natural Settings. *Pediatrics* 107(6): E105.

Potter, Lincoln R

2011 Regulation and Therapeutic Targeting of Peptide-Activated Receptor Guanylyl Cyclases. *Pharmacology & Therapeutics* 130(1): 71–82.

Poulton, Alison S., Elaine Melzer, Paul R. Tait, et al.

2013 Growth and Pubertal Development of Adolescent Boys on Stimulant Medication for Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Medical Journal of Australia* 198(1). <https://www.mja.com.au/journal/2013/198/1/growth-and-pubertal-development-adolescent-boys-stimulant-medication-attention>, accessed April 21, 2013.

Qi, Maosong, and Elaine A. Elion

2005 MAP Kinase Pathways. *Journal of Cell Science* 118(16): 3569–3572.

- Reif, Andreas et al.
2009 Influence of Functional Variant of Neuronal Nitric Oxide Synthase on Impulsive Behaviors in Humans.
JAMA Psychiatry Vol 66, No. 1
- Retz, Wolfgang, and Rachel G. Klein
2010 Attention-Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) in Adults: 18 Tables. Karger Publishers.
- Retz-Junginger, P., W. Retz, D. Blocher, et al.
2002 Wender Utah Rating Scale (WURS-K) Die Deutsche Kurzform Zur Retrospektiven Erfassung Des Hyperkinetischen Syndroms Bei Erwachsenen. Der Nervenarzt 73(9): 830–838.
- Ricaurte, G A, L S Seiden, and C R Schuster
1984 Further Evidence That Amphetamines Produce Long-Lasting Dopamine Neurochemical Deficits by Destroying Dopamine Nerve Fibers. Brain Research 303(2): 359–364.
- Rizzi, Thais S., Alejandro Arias-Vasquez, Nanda Rommelse, et al.
2011 The ATXN1 and TRIM31 Genes Are Related to Intelligence in an ADHD Background: Evidence from a Large Collaborative Study Totaling 4,963 Subjects. American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics 156(2): 145–157.
- Roeske, D, K U Ludwig, N Neuhoff, et al.
2011 First Genome-Wide Association Scan on Neurophysiological Endophenotypes Points to Trans-Regulation Effects on SLC2A3 in Dyslexic Children. Molecular Psychiatry 16(1): 97–107.
- Saino, Makoto, Tomoko Maruyama, Takao Sekiya, Takamasa Kayama, and Yoshinori Murakami
2004 Inhibition of Angiogenesis in Human Glioma Cell Lines by Antisense RNA from the Soluble Guanylate Cyclase Genes, GUCY1A3 and GUCY1B3. Oncology Reports 12(1): 47–52.
- Sakamoto, Masami, Hiromi Hirata, Toshiyuki Ohtsuka, Yasumasa Bessho, and Ryoichiro Kageyama
2003 The Basic Helix-Loop-Helix Genes Hesr1/Hey1 and Hesr2/Hey2 Regulate Maintenance of Neural Precursor Cells in the Brain. The Journal of Biological Chemistry 278(45): 44808–44815.

Saunders, C, J V Ferrer, L Shi, et al.

2000 Amphetamine-Induced Loss of Human Dopamine Transporter Activity: An Internalization-Dependent and Cocaine-Sensitive Mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(12): 6850–6855.

Schmidt, A. J., J. C. Krieg, H. W. Clement, et al.

2010 Impact of Drugs Approved for Treating ADHD on the Cell Survival and Energy Metabolism: An in-Vitro Study in Human Neuronal and Immune Cells. *Journal of Psychopharmacology* 24(12): 1829–1833.

Schmidt, Kristopher L., Nancy Marcus-Gueret, Adetayo Adeleye, et al.

2009 The Cell Migration Molecule UNC-53/NAV2 Is Linked to the ARP2/3 Complex by ABI-1, *Development* 136(4): 563–574.

Schmidt, Stefan, Miriam Richter, Dirk Montag, et al.

2008 Neuronal Functions, Feeding Behavior, and Energy Balance in Slc2a3^{+/-} Mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism* 295(5): E1084–E1094.

Schmitz, Sabine

2011 *Der Experimentator: Zellkultur*. Springer DE.

Schmitz, Y, C J Lee, C Schmauss, F Gonon, and D Sulzer

2001 Amphetamine Distorts Stimulation-Dependent Dopamine Overflow: Effects on D2 Autoreceptors, Transporters, and Synaptic Vesicle Stores. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21(16): 5916–5924.

Seidler, Eduard

2004 „Zappelphilipp“ Und ADHS: Von Der Unart Zur Krankheit (30,01,2004). *Aerzteblatt.de*. <http://www.aerzteblatt.de/archiv/40288/Zappelphilipp-und-ADHS-Von-der-Unart-zur-Krankheit>, accessed June 2, 2013.

Shayevitz, Christina, Ori S Cohen, Stephen V Faraone, and Stephen J Glatt

2012 A Re-Review of the Association between the NOTCH4 Locus and Schizophrenia. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 159B(5): 477–483.

Simpson, Ian A, Donard Dwyer, Daniela Malide, et al.

2008 The Facilitative Glucose Transporter GLUT3: 20 Years of Distinction. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 295(2): E242–253.

Selek S, Savas HA, Gergerlioglu HS, Bulut M, Yilmaz HR

2008 Oxidative imbalance in adult attention deficit/hyperactivity disorder. *Biological Psychology* 79 (2): 256-9.

Stringham, Eve, Nathalie Pujol, Joel Vandekerckhove, and Thierry Bogaert
2002 Unc-53 Controls Longitudinal Migration in *C. Elegans*. *Development* (Cambridge, England) 129(14): 3367–3379.

Suh, Sang Won, Koji Aoyama, Yongmei Chen, et al.
2003 Hypoglycemic Neuronal Death and Cognitive Impairment Are Prevented by poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors Administered after Hypoglycemia. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23(33): 10681–10690,

Sulzer, David, Mark S Sonders, Nathan W Poulsen, and Aurelio Galli
2005 Mechanisms of Neurotransmitter Release by Amphetamines: A Review. *Progress in Neurobiology* 75(6): 406–433.

Suzuki, E, G Yagi, T Nakaki, S Kanba, and M Asai
2001 Elevated Plasma Nitrate Levels in Depressive States. *Journal of Affective Disorders* 63(1-3): 221–224.

Swati, Chauhan, Jelen Filip, Sharina Iraidia, and Martin Emil
2012 The G-Protein Regulator LGN Modulates the Activity of the NO Receptor Soluble Guanylate Cyclase. *Biochemical Journal* 446(3): 445–453.

Takeda, Kohsuke, and Hidenori Ichijo
2002 Neuronal p38 MAPK Signalling: An Emerging Regulator of Cell Fate and Function in the Nervous System. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 7(11): 1099–1111,

Tamara Maes, Anna Barceló
2002 Neuron Navigator: A Human Gene Family with Homology to Unc-53, a Cell Guidance Gene from *Caenorhabditis Elegans*. *Genomics* 80(1): 21–30,

ter Huurne et al.
2015 Methylphenidate alters selective attention by amplifying salience. *Psychopharmacology* 232: 4317-4323.

Thermo Scientific
2010 Nano Drop 1000 Spectrophotometer- v3.8 - User's-Manual. Wilmington. www.nanodrop.com, accessed September 12, 2011,

Thomas, Theresa Currier, Paul J Kruzich, B Matthew Joyce, et al.
2007 Dopamine D4 Receptor Knockout Mice Exhibit Neurochemical Changes Consistent with Decreased Dopamine Release. *Journal of Neuroscience Methods* 166(2): 306–314.

- Trepel, Martin
2008 Neuroanatomie Mit StudentConsult-Zugang: Struktur Und Funktion von Trepel. Martin. Auflage: 4. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
- Vaidya, Chandan J, and Melanie Stollstorff
2008 Cognitive Neuroscience of Attention Deficit Hyperactivity Disorder: Current Status and Working Hypotheses. *Developmental Disabilities Research Reviews* 14(4): 261–267.
- Valjent, Emmanuel, Vincent Pascoli, Per Svenningsson, et al.
2005 From The Cover: Regulation of a Protein Phosphatase Cascade Allows Convergent Dopamine and Glutamate Signals to Activate ERK in the Striatum. *Science Signaling* 102(2): 491,
- Villaronga, M A, D N Lavery, C L Bevan, S Llanos, and B Belandia
2010 HEY1 Leu94Met Gene Polymorphism Dramatically Modifies Its Biological Functions. *Oncogene* 29(3): 411–420,
- Volkow, Nora D, Joanna S Fowler, Gene-Jack Wang, et al.
2008 Methylphenidate Decreased the Amount of Glucose Needed by the Brain to Perform a Cognitive Task. *PloS One* 3(4): e2017.
- Volkow, Nora D., Gene-Jack Wang, Scott H. Kollins, et al.
2009 Evaluating Dopamine Reward Pathway in ADHD. *JAMA : The Journal of the American Medical Association* 302(10): 1084–1091,
- Walitza, Susanne, Kristina Kämpf, Rajaraman Gnana Oli, et al.
2010 Prospective Follow-up Studies Found No Chromosomal Mutagenicity of Methylphenidate Therapy in ADHD Affected Children. *Toxicology Letters* 193(1): 4–8.
- Watase, Kei, Jennifer R. Gatchel, Yaling Sun, et al.
2007 Lithium Therapy Improves Neurological Function and Hippocampal Dendritic Arborization in a Spinocerebellar Ataxia Type 1 Mouse Model. *PLoS Medicine* 4(5): e182.
- Weinberg, Robert A.
2006 The Biology of Cancer. The Biology of Cancer. Garland Science.
- Wender, P H, L E Wolf, and J Wasserstein
2001 Adults with ADHD. An Overview. *Annals of the New York Academy of Sciences* 931: 1–16.

- Van West, Dirk, Stephan Claes, and Dirk Deboutte
2009 Differences in Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Functioning among Children with ADHD Predominantly Inattentive and Combined Types. *European Child & Adolescent Psychiatry* 18(9): 543–553.
- Yatin, Servet M, Gregory M Miller, Courtney Norton, and Bertha K Madras
2002 Dopamine Transporter-Dependent Induction of C-Fos in HEK Cells. *Synapse* (New York, N.Y.) 45(1): 52–65.
- Yazir, Yusufhan, Tijen Utkan, and Feyza Aricioglu
2012 Inhibition of Neuronal Nitric Oxide Synthase and Soluble Guanylate Cyclase Prevents Depression-like Behaviour in Rats Exposed to Chronic Unpredictable Mild Stress. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 111(3): 154–160,
- Yoshimasu, Kouichi, William J Barbaresi, Robert C Colligan, et al.
2011 Written-Language Disorder among Children with and without ADHD in a Population-Based Birth Cohort. *Pediatrics* 128(3): e605–612.
- Zamora-Perez, Ana L., Blanca P. Lazalde-Ramos, Martha G. Sosa-Macías, et al.
2011 Methylphenidate Lacks Genotoxic Effects in Mouse Peripheral Blood Erythrocytes. *Drug and Chemical Toxicology* 34(3): 294–299.
- Zhang, Can, Andrew Browne, Daniel Child, and Rudolph E. Tanzi
2010 Curcumin Decreases Amyloid-B Peptide Levels by Attenuating the Maturation of Amyloid-B Precursor Protein. *Journal of Biological Chemistry* 285(37): 28472–28480,
- Zhang, Nan, Jun-Kai Lin, Juan Chen, et al.
2013 MicroRNA 375 Mediates the Signaling Pathway of Corticotropin-Releasing Factor (CRF) Regulating Pro-Opiomelanocortin (POMC) Expression by Targeting Mitogen-Activated Protein Kinase 8. *The Journal of Biological Chemistry*.

Danksagung

Für die aufmunternde, liebevolle und umfassende Unterstützung während meines Studiums möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden herzlich bedanken.

Für die Unterstützung, Zusammenarbeit, Betreuung und Korrektur meiner Doktorarbeit danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Andreas Reif, meiner Betreuerin Dr. med.

Sarah Kittel-Schneider, Dr. Claus-Jürgen Scholz

und im Labor Max Hilscher, Theresia Töpner, Joyce Auer und Dr. Juliane Kopf.

Lebenslauf

Ricarda Schwarz, geboren am 12.09.1989 in Hildesheim

1996-2000 Grundschule Itzum, Hildesheim
2000-2009 Gymnasium Andreanum, Hildesheim
2006 Kodaikanal International School, Tamil Nadu, Indien
2009-2015 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität
2014-2015 Würzburg
 Praktisches Jahr am Diakonissenkrankenhaus Flensburg (Radiologie),
 Masterton Hospital in Neuseeland (Chiurgie) und Asklepios Klinikum
 Hamburg Harburg (Innere Medizin)

Kongressbeiträge

Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde (DGPPN), Berlin, November 2012

Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie (AGNP), München, September 2013

21st World Congress of Psychiatric Genetics (WCPG), Boston, Oktober 2013

Unter dem Titel „Methylphenidate-regulated genes in lymphoblastoid cell lines of adult ADHD patients“ Auszeichnung der Forschungsergebnisse mit dem Young Scientist Award an Sarah Kittel-Schneider, 4th World Congress on ADHD, Milan, 2013

Publikationen

Schwarz R, Reif A, Scholz CJ, Weissflog L, Schmidt B, Lesch KP, Jacob C, Reichert S, Heupel J, Volkert J, Kopf J, Hilscher M, Weber H, Kittel-Schneider S.: A preliminary study on methylphenidate-regulated gene expression in lymphoblastoid cells of ADHD patients, World Journal of Biological Psychiatry, 2014

Kittel-Schneider, S., Schreck, S., Ziegler, C., Weißflog, L., Hilscher, M., **Schwarz, R.**, Schnetzler, L., Neuner, M., Reif, A.: Lithium-induced clock gene expression in lymphoblastoid cells of bipolar affective patients, Pharmacopsychiatry, 2015