

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität  
Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Jürgen Deckert

**Die Rolle von Progranulin in der bipolar-affektiven Störung**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt  
von  
Johannes Weigl  
aus  
Landshut

Würzburg, November 2013

Referent: Prof. Dr. med. Andreas Reif  
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Stephan Klebe  
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 22.09.2014

Der Promovend ist Arzt

## Abkürzungen

3'UTR	3'Untranslated Region
aADHS	adultes Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom
Abb.	Abbildung
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ANCOVA	Analysis of covariance
Ank3	Ankyrin 3
ANOVA	Analysis of variance
ATP	Adenosintriphosphat
BDI-II	Beck-Depressions-Inventar II
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
bp	Basenpaare, base pairs
BPD	bipolar disorder
CD40	Cluster of differentiation 40, immunphänotypisches Zelloberflächenmerkmal
CNV	Copy number variation
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
COX	Cyclooxygenase
CRH	Corticotropin releasing hormone
DGKH	Diacylglycerol kinase eta
DNA	Deoxyribonucleic acid
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Version IV
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FTD	Frontotemporale Demenz
FTLD	Frontotemporale Lobärdegeneration
FTLD-U	Ubiquitin-positive Frontotemporale Lobärdegeneration

GRN	Progranulin-Gen
GWAS	Genomweite Assoziationsstudien
GxE	Gen-Umwelt-Interaktion
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HRP	Horse Radish Peroxidase
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
IL	Interleukin
MADRS	Montgomery Asberg Depression Scale
Met	Methionin
MIR659	MicroRNA-659
mRNA	Messenger ribonucleic acid
PI3P/Akt	Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B
rSNP	regulatory SNP
SD	Standard deviation
SNP	Single nucleotide polymorphism, Einzelbasenpolymorphismus
SORT1	Sortilin 1
srSNP	structural RNA SNP
Tab.	Tabelle
TDP-43	TAR DNA-binding protein
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
Val	Valproat
YMRS	Young Mania Rating Scale
ZNS	Zentralnervensystem

1	Einleitung .....	1
1.1	Grundlagen der bipolaren affektiven Störung.....	1
1.1.1	Historischer Hintergrund .....	1
1.1.2	Definition, Klassifikation und Epidemiologie.....	2
1.1.3	Ätiologie .....	4
1.1.4	Klinisches Bild und Differentialdiagnosen.....	8
1.2	Entwicklung neuer Diagnosekriterien der bipolaren Erkrankung .....	9
1.2.1	Endophänotypen .....	9
1.2.2	Biomarker und Pathomechanismen .....	10
1.3	Progranulin als möglicher Biomarker der bipolaren Störung.....	14
1.3.1	Protein- und Genstruktur .....	14
1.3.2	Granuline .....	15
1.3.3	Funktion.....	16
1.3.4	Mutationen im Progranulin-Gen.....	17
1.4	Fragestellung.....	20
2	Material und Methoden .....	21
2.1	Material .....	21
2.1.1	Stichprobe.....	21
2.1.2	ELISA-Kit .....	22
2.1.3	Gebrauchs- und Verbrauchsgegenstände .....	23
2.1.4	Geräte.....	24
2.1.5	Software.....	24
2.1.6	Sonstiges.....	24
2.2	Methodik der Materialgewinnung .....	25
2.2.1	Versuchspersonenrekrutierung .....	25
2.2.2	Blutentnahme und Aliquotierung des Plasmas.....	26

2.3	Methodik des Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) .....	26
2.3.1	Grundlagen des ELISAs .....	26
2.3.2	Vorbereitung des ELISAs.....	27
2.3.3	Durchführung des ELISAs .....	28
2.4	Methodik der Genotypisierung .....	30
2.5	Statistische Analyse .....	31
3	Ergebnisse .....	32
3.1	Progranulinkonzentrationen von Patienten und Kontrollen.....	32
3.2	Genotypisierung der GRN-Polymorphismen.....	34
3.3	Auswirkungen der GRN-Polymorphismen auf den Progranulinspiegel.....	36
4	Diskussion .....	37
4.1	Progranulinmangel als Pathomechanismus der bipolaren Erkrankung .....	37
4.2	Altersabhängigkeit des peripheren Progranulinspiegels.....	40
4.3	Genetische Untersuchungen des Progranulin-Gens.....	41
4.3.1	Krankheitswert der untersuchten SNPs .....	42
4.3.2	Assoziation von GRN-Mutationen zur bipolaren Störung .....	43
4.4	Grenzen und Fehlerquellen der Arbeit.....	44
5	Zusammenfassung.....	46
6	Literatur.....	48
7	Abbildungsnachweis .....	55

# 1 Einleitung

## 1.1 Grundlagen der bipolaren affektiven Störung

### 1.1.1 Historischer Hintergrund

„Die Schönheit der Welt hat zwei Schneiden, die das Herz zerteilen. Eine ist Gelächter, die andere Seelenqual“ [1]. Die britische Schriftstellerin Virginia Woolf, welche bis zu ihrem Suizid im Jahre 1941 selbst unter der bipolaren affektiven Störung litt, charakterisierte die Erkrankung auf diese Weise.

Bereits im 5. Jahrhundert verwendete Hippokrates von Kos die beiden Begriffe „Mania“ und „Melancholie“. Letzterer wurde später durch den Fachbegriff „Depression“ ersetzt. Noch im 1. Jahrhundert n. Chr. erkannte der Arzt Aretaeus von Kappadokien die Zusammengehörigkeit dieser dualistischen Krankheitsbilder. Jedoch geriet im Mittelalter der rationale Zeitgeist der Antike in Vergessenheit und erst im 19. Jahrhundert wurde die Begrifflichkeit von Jean-Pierre Falret als „la folie circulaire“ (zirkuläres Irresein) und von Emil Kraepelin als „manisch-depressives Irresein“ wieder aufgegriffen. Nach der NS-Zeit, in der viele psychiatrische Patienten dem „Euthanasie-Programm“ der Nationalsozialisten zum Opfer fielen, etablierte sich durch Jules Angst und Carlo Perris die Differenzierung zwischen unipolarer und bipolarer Depression.

Überdies ziehen sich die Beschreibungen manisch-depressiver Krankheitszustände berühmter Persönlichkeiten wie ein roter Faden durch die Geschichte der letzten Jahrhunderte. Insbesondere Künstler aller Richtungen und Epochen, wie Virginia Woolf, aber auch Robert Schumann, Vincent van Gogh, Ernest Hemingway, Kurt Cobain und viele weitere Persönlichkeiten drücken dieses Krankheitsbild expressiv und somit sehr sichtbar aus. Phasen übersteigter Stimmungshochs lassen Ängste und Zweifel schwinden, bringen gesellschaftliche Normen und Tabus zum Einsturz und befördern eine scheinbar unerschöpfliche Schaffenskraft zu Tage. Erlangen bipolare Patienten auf diese Weise Zugang zu einer „höheren Ebene der Kreativität“? Studien geben möglicherweise Hinweise auf das gehäufte Auftreten der Erkrankung bei kreativen Persönlichkeiten [2] oder belegen zumindest eine gewisse Produktivitätssteigerung in (hypo-)manischen Phasen.

Angesichts vieler großer Werke, welche psychiatrisch erkrankte Künstler schufen, und ohne die die Menschheit gewiss ein Stück ärmer wäre, stellt sich die Frage, ob es falsch ist, diese Patienten als „krank“ zu stigmatisieren und ihnen z.T. ihre scheinbare Selbstbestimmung zu entreißen. Bedenkt man allerdings den Preis, den diese Kreativität und Genialität abverlangt und bedenkt man ferner, dass der durch die Krankheit geleitete Mensch ebenso wenig Selbstbestimmung besitzt, wird diese Frage wohl hinfällig.

Abgesehen von Robert Schumann, der wenige Jahre nach einem gescheiterten Suizidversuch in einer Heilanstalt verhungerte, fanden alle oben erwähnten Persönlichkeiten an einem gewissen Punkt keinen anderen „Ausweg“ mehr, als ihrem Leben mit eigener Hand ein Ende zu setzen.

### 1.1.2 Definition, Klassifikation und Epidemiologie

Die zum Formenkreis der affektiven Erkrankungen zählende bipolare Störung ist durch einen phasenhaften Verlauf zwischen depressiven und manischen bzw. hypomanischen Zuständen gekennzeichnet. Dazwischen liegen mehr oder weniger symptomfreie Intervalle. Es lassen sich sowohl Auswirkungen auf Stimmung, als auch auf Antrieb und Kognition beobachten.

Erfüllen die Phasen gehobener Stimmung und gesteigerten Antriebs Kriterien einer Manie, spricht man von einer Bipolar-I-Störung. Sind lediglich hypomane Phasen, in welchen die Kennzeichen einer Manie in abgeschwächter Ausprägung vorhanden sind, zu beobachten, lässt sich nach DSM-IV [3] eine Bipolar-II-Störung diagnostizieren. Neuere wissenschaftliche Publikationen legen außerdem eine weitere Einteilung in Bipolar-III- und Bipolar-IV-Störung nahe [4]. Erstere bezeichnet eine rezidivierende depressive Störung bei zu Grunde liegendem hyperthymen Temperament – alternativ auch hypomane Phasen ausschließlich unter antidepressiver Behandlung –, letztere rezidivierende Depressionen mit bipolarer Familienanamnese. Darüber hinaus können auch gemischte Episoden, mit gleichzeitigem Bestehen depressiver und manischer Teilaspekte, auftreten.

Zu erwähnen sei noch, dass das DSM-IV im Gegensatz zur ICD-10 auch die Zykllothymia in den Formenkreis der bipolaren Erkrankungen aufnimmt. Diese zeichnet

sich durch leichtere Stimmungsschwankungen aus, welche jedoch noch nicht die Kriterien einer Depression bzw. (Hypo-)Manie erfüllen.

Eine klare Abgrenzung zu schizoaffektiven Störungen und insbesondere zur unipolaren Depression stellt die derzeitigen diagnostischen Möglichkeiten immer noch vor Probleme [5]. Nicht zuletzt daher sowie durch die hohe Dunkelziffer an Erkrankten divergieren die epidemiologischen Schätzungen bzgl. der Häufigkeit der Erkrankung relativ stark. Es werden je nach Diagnosekriterien Prävalenzen von 0,5% bis über 10% [6] angegeben, wobei für diese Zahlen u.a. die jeweilige Abgrenzung zur unipolaren Depression oder Major Depression ausschlaggebend war. Aktuelle Studiendaten ergaben bei breiter Diagnosestellung eine Lebenszeitprävalenz von 4% [7]. Betrachtet man eine 2011 veröffentlichte großangelegte Metaanalyse elf europäischer Studien, ist jedoch eine Lebenszeitprävalenz von knapp 1% wohl als realistischer Wert anzusehen [8].

Das durchschnittliche Erkrankungsalter bewegt sich im Bereich der späten Adoleszenz und des frühen Erwachsenenalters. Eine international angelegte Studie mit 1566 Patienten bezifferte das mittlere Erkrankungsalter mit 24 Jahren für die Bipolar-I- und mit 30 Jahren für die Bipolar-II-Störung [9] (s. Abb. 1.1), wobei interessanterweise weiterführende Studien ergaben, dass ein familiärer Hintergrund bzgl. der bipolaren Störung gehäuft bei frühem Auftreten der Erkrankung zu beobachten ist [10]. Andere aktuelle Studien gehen, bei Betrachtung aller bipolaren Patienten, oftmals von einem noch früheren Erkrankungsgipfel aus [11]. Mit einer ausgeglichenen Geschlechterverteilung unterscheidet sich die bipolare Störung von der unipolaren Depression, bei welcher mehr Frauen betroffen sind.

Obige epidemiologische Zusammenfassung lässt erkennen, welche Schwierigkeiten die Abgrenzung des breiten Spektrums der bipolaren Erkrankung zur unipolaren Depression, dem ADHS oder Psychosen bereitet. Dies wird v.a. durch symptomatische und syndromale Überschneidungen hervorgerufen und hat negative Auswirkungen auf die Früherkennung und damit die frühzeitige Behandlung. Die Lösung des Problems wird allein auf klinischer Ebene wohl nur schwer zu finden sein.

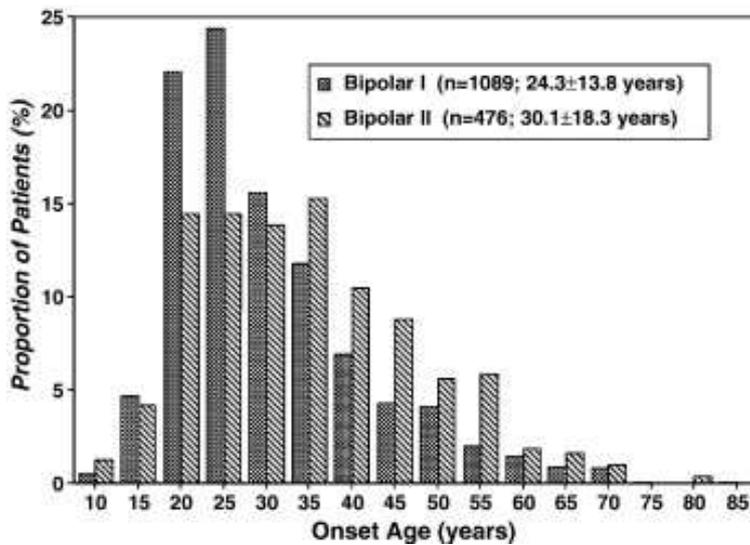


Abb. 1.1: Erkrankungsalter bei Bipolar-I- und Bipolar-II-Störung (entnommen aus [9])

### 1.1.3 Ätiologie

Die bipolare affektive Störung stellt eine multifaktorielle Erkrankung mit vielfältigen Ursachen dar. Nicht zuletzt auf Grund dieser Heterogenität und dem Zusammenwirken von genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren wird immer noch nach einem umfassenden ätiologischen Erklärungsansatz gesucht.

Eine besondere Bedeutung kommt dabei den genetischen Faktoren der Krankheitsentstehung zu, da bei der bipolaren Störung zusammen mit dem adulten ADHS und Autismus-Spektrumerkrankungen die höchste Erblichkeit im Bereich der psychiatrischen Erkrankungen angenommen wird. Viele in der Vergangenheit publizierte Daten untermauern diese Hypothese und ergeben eine Heritabilität von bis zu 0,80 [12]. Die bislang größte Studie wurde in Schweden an Hand von über 2 Millionen Familien durchgeführt und konstatierte eine Erblichkeit von 0,59 [13]. Des Weiteren ist das Erkrankungsrisiko für einen Verwandten 1. Grades im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung um das 10-fache erhöht [14], wobei bemerkenswerter Weise auch das Risiko für eine unipolare Depression und eine Schizophrenie ansteigt, was auf sich überschneidende pathogenetische Faktoren hindeutet.

Auf molekulargenetischer Ebene wurden zur Identifizierung ätiopathogenetisch relevanter Risikogenvarianten sowohl Kopplungs- als auch Assoziationsstudien durchgeführt. Dabei sind momentan zwei Modelle, welche die komplexe polygene Vererbung erklären sollen, in der Diskussion. Das „common variant, common disease“-Modell geht davon aus, dass eine Ansammlung zahlreicher, häufig vorkommender DNA-Varianten die Ursache der Erkrankung darstellt, wohingegen das „multiple rare variant, common disease“-Modell wenige, selten vorkommende Varianten als Krankheitsursache verantwortlich macht [15] [16].

Im Zuge von Kopplungsanalysen wurde zwar die Kopplung verschiedener Loci sowohl belegt als auch häufig widerlegt, jedoch konnte oftmals das zu Grunde liegende Gen nicht identifiziert werden und nur wenige Ergebnisse hielten groß angelegten Metaanalysen stand. So waren bei einer Metaanalyse von über 5000 Individuen in über 1000 Familien von McQueen et al. [17] die Regionen 6q21-25, 8q24 und 11q replizierbar. Darüber hinaus konnten auch Loci, die nur in wenigen Familien gekoppelt waren, identifiziert werden, so z.B. 12q22-24. Dieser beinhaltet das Gen P2RX7, welches einen ATP-Rezeptor codiert, dem möglicherweise eine Rolle im Immunsystem zukommt [18]. Ein Vorteil der Kopplungsanalysen ist dabei, dass seltene genetische Varianten, die jedoch eine relativ hohe Effektstärke aufweisen, nachgewiesen werden können. Diese würden bei der Kombination vieler Familien oder bei großen Assoziationsstudien aufgrund ihrer Seltenheit untergehen.

Bei Assoziationsstudien erfolgt eine gezielte, hypothesengeleitete Analyse einzelner Kandidatengene bzw. Genregionen, wobei die Ergebnisse in der Vergangenheit oftmals ähnlich ernüchternd waren. Evidenz für eine Assoziation mit der Erkrankung zeigten jedoch bspw. das Gen für den „brain-derived neurotrophic factor“ BDNF [19], sowie das Dopamintransporter-Gen SLC6A3 [20], welches auch bei schizophrenen Psychosen von Bedeutung ist. Der Genort des Dopamin-abbauenden Enzyms „Catechol-O-Methyltransferase“ COMT war ebenfalls Gegenstand mehrerer Assoziationsstudien [21], wobei bei der assoziierten Met-Variante des Val-108/158-Met-Polymorphismus ein verstärkter Abbau von Dopamin im Frontalhirn zu beobachten ist. Aus dem Problem der häufig nicht zu replizierenden Ergebnisse kann als Schlussfolgerung gezogen werden, dass eine große und gründlich charakterisierte Stichprobe von fundamentaler Bedeutung für die wissenschaftliche Verwendbarkeit der Daten ist.

In jüngerer Vergangenheit rückten hypothesenfreie genomweite Assoziationsstudien (GWAS) angesichts neuer technologischer Möglichkeiten in den Fokus wissenschaftlicher Forschung. Dieses Verfahren benötigt eine sehr große Stichprobe, um die auf Grund der hohen Anzahl an parallel untersuchten Polymorphismen möglicherweise resultierenden falsch-positiven Ergebnisse zu vermeiden. Es können in einem hypothesenfreien Ansatz derzeit 1 bis 2 Millionen Polymorphismen genotypisiert werden, wobei sich die GWAS besonders gut zum Nachweis sogenannter „common variants“ eignet, die zwar häufig vorkommen, aber nur einen kleinen Beitrag zur Krankheitsentstehung leisten. Im Zuge dieser GWAS konnten einige Suszeptibilitätsgene identifiziert werden [22], wobei ODZ4 [23], NCAN [24], DGKH [25], CACNA1C und ANK3 [26] die wohl größte Evidenz aufweisen. DGKH kodiert das Enzym Diacylglycerol-Kinase  $\epsilon$ , welches ein Schlüsselprotein im Lithium-sensitiven Phosphatidyl-Inositol-Signalweg darstellt [27]. CACNA1C kodiert für einen spannungsabhängigen Kalziumkanal und Ankyrin-G, das Genprodukt von ANK3 ist in Axonen und Ranvierschen Schnürringen lokalisiert und spielt eine Rolle in der neuronalen Informationsübertragung [28]. Nähere pathomechanistische Zusammenhänge dazu sollen im Kapitel 1.2.2 beschrieben werden.

Zu erwähnen ist jedoch, dass diese Risikogenvarianten nicht nur mit der bipolaren Störung assoziiert sind, sondern z.T. auch bei Patientenkohorten anderer Erkrankungen des psychiatrischen Formenkreises zu finden sind. So ist z.B. DGKH mit unipolarer Depression und aADHS [29], ANK3 mit Schizophrenie [30] und CACNA1C sowohl mit Schizophrenie [31] als auch unipolarer Depression [32] assoziiert. Dies spricht also dafür, dass die Suszeptibilitätsgene zum Auftreten bestimmter gemeinsamer Symptome und Syndrome beitragen und nicht spezifisch mit der jeweiligen Erkrankung assoziiert sind.

Durch den Zugewinn neuer, exakterer Möglichkeiten im Bereich der Genom-Analyse wird den sogenannten „*copy number variants*“ (CNV) immer mehr Aufmerksamkeit geschenkt. Diese strukturellen Veränderungen des Genoms, wie Duplikationen und Deletionen, zeichnen sich häufig durch eine hohe Effektstärke, jedoch ein eher seltenes Auftreten aus, was dem „common disease, multiple rare variant“-Modell entspricht. Die Studienlage ist hierbei jedoch noch dürftig. Zhang et al. [33] beobachteten bei einer Kohorte von 1001 bipolaren Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikant

häufigeres Auftreten spezifischer Deletionen, was durch Grozeva et al. [34] anhand von 1697 Patienten nicht bestätigt werden konnte. Bei derlei widersprüchlichen Ergebnissen und da CNVs im Allgemeinen nur bei einzelnen Familien vorkommen, muss man momentan von einem – wenn überhaupt – geringen Anteil der CNVs an den bipolaren Krankheitsfällen ausgehen.

Zusammenfassend scheinen wohl beide Theorien ihre Existenzberechtigung zu haben und sowohl seltene DNA-Veränderungen mit hoher Effektstärke als auch die Ansammlung vieler häufiger Genvarianten mit nur geringer Effektstärke tragen zur Pathogenese der bipolaren Störung bei.

Daneben spielen aber auch Umweltfaktoren eine nicht zu vernachlässigende ätiologische Rolle. So können zum einen aktuelle psychosoziale Belastungsfaktoren eine Episode anstoßen, zum anderen können auch traumatische Ereignisse in der Lebensgeschichte das Risiko, an einer bipolaren Störung zu erkranken, erhöhen. Bspw. lässt sich bei Patienten anamnestisch gehäuft sexueller Missbrauch in der Kindheit beobachten, welcher sich zusätzlich negativ auf die Prognose der Erkrankung auswirken kann [35]. Des Weiteren wird auch ein Anteil bestimmter Persönlichkeitsfaktoren an der Krankheitsentstehung diskutiert.

Abschließend lässt sich anmerken, dass man sich von einer klaren Trennung zwischen genetischen und umweltbedingten Ursachen immer mehr distanziert und vielmehr eine Krankheitsentstehung im Sinne einer Gen-Umwelt-Interaktion (GxE) propagiert. Besteht bei einem Individuum eine genetische Prädisposition, bedarf es häufig ungünstiger Umweltbedingungen, wie oben beschrieben, um die Erkrankung auszulösen. Umgekehrt kann ein Individuum aus bislang noch nicht bekannten Gründen eine Resilienz gegenüber psychosozialen Belastungen und verschiedenen Traumata aufweisen. Auch epigenetische Phänomene, wie DNA-Methylierungen oder die Modifikation von Histonen, könnten hierbei von Bedeutung sein. Bzgl. psychiatrischer Erkrankungen können bspw. akute Stresssituationen ein Ungleichgewicht in der Histon-Acetylierung hervorrufen. Für weiterführende Informationen zur Epigenetik psychiatrischer Störungen soll hier auf Tsankova et al. 2007 [36] verwiesen werden. Die

Rolle der GxE ist bei einer Heritabilität der BPD von 0,8 natürlich begrenzt und darf nicht als alleiniges Erklärungsmodell zur Krankheitsursache dienen.

Die pathogenetischen Muster, die sich aus diesen ätiologischen Ansätzen ergeben, sollen im Rahmen der Beschreibung möglicher Biomarker der bipolaren Störung (s. Kapitel.1.2.2) umrissen werden

#### 1.1.4 Klinisches Bild und Differentialdiagnosen

Das Krankheitsbild der bipolaren Störung kann bzgl. Symptomatik, Verlauf, Prognose und dem Ansprechen auf medikamentöse Therapie sehr stark variieren. Bemerkenswert ist dabei, dass die Krankheit zwischen den manischen bzw. depressiven Phasen nicht unbedingt voll remittiert. Während bei einem Teil der Patienten keinerlei Einschränkungen in remittierten Intervallen zu beobachten sind, gehen manche Studien davon aus, dass bis zu 50% der Erkrankten chronisch unter subklinischen Symptomen der bipolaren Störung leiden [37, 38]. Dieser Umstand ist neben der erheblichen Minderung der Lebensqualität des Betroffenen natürlich auch von nicht zu vernachlässigender sozioökonomischer Bedeutung.

Neben der Heterogenität des klinischen Bildes, stellt die Abgrenzung verschiedener anderer psychiatrischer Erkrankungen eine diagnostische Schwierigkeit dar. Als Differentialdiagnosen sind u.a. das adulte Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom (aADHS) und die unipolare Depression [39] von Bedeutung. Da bei der medikamentösen Therapie der unipolaren Depression in erster Linie Antidepressiva und bei adultem ADHS Psychostimulantien eingesetzt werden, bei der bipolaren Störung hingegen bevorzugt Stimmungsstabilisatoren verwendet werden, kann eine Fehldiagnose die Einleitung einer adäquaten Therapie erheblich verzögern. Bei der Abgrenzung zur unipolaren Depression gestaltet sich v.a. eine Frühdiagnose schwierig, da die Patienten häufig noch keine manische bzw. hypomane Phase durchlebt haben und so eine bipolare Störung lediglich auf Grund positiver Familienanamnese vermutet werden kann. Ein weiterer Hinweis für eine bipolare Erkrankung kann das sehr plötzliche Eintreten einer depressiven Phase innerhalb einer Woche sein, was eher ein Charakteristikum der bipolaren im Gegensatz zur unipolaren Depression darstellt

[40]. Bei inadäquater Monotherapie mit einem Antidepressivum besteht die Gefahr, dass eine erste manische bzw. hypomanische Phase provoziert wird.

Patienten mit aADHS weisen gehäuft komorbide depressive Episoden auf [41], zudem ist bei einem großen Anteil der Patienten eine emotionale Dysregulation zu beobachten. Stimmungsschwankungen dieser Art können differentialdiagnostische Überlegungen erschweren. Hinzu kommt, dass bei bipolar Erkrankten bei 10 bis 20% ein adultes ADHS als Komorbidität diagnostiziert werden kann [42]. Abschließend lässt sich bemerken, dass eine eindeutige Diagnosestellung aus klinischer Sicht schwierig sein kann, jedoch von großer Bedeutung für die daraus folgende Therapie ist. Dies stellt, wie auch die genetische Heterogenität, einen Grund dafür dar, nach weiteren Kriterien zur korrekten Diagnosestellung zu forschen.

## **1.2 Entwicklung neuer Diagnosekriterien der bipolaren Erkrankung**

Wie bereits oben erwähnt, ist die klinische Präsentation der bipolaren Erkrankung sehr inhomogen. Klassifikationssysteme wie das DSM-IV oder die ICD-10 stellen lediglich theoretische Konstrukte dar, die anhand psychopathologischer Faktoren, also des klinischen Erscheinungsbildes, entworfen wurden und neurobiologische Gesichtspunkte außer Acht lassen. Um diese Kluft zwischen Genetik und Symptomatologie zu schließen, wird nach neuen Kriterien gesucht, welche eine Diagnosestellung mit höherer Spezifität und Sensitivität erlauben und zugleich eine eventuelle Untergliederung der Erkrankung in verschiedene Subtypen ermöglichen. Eine derartige Subtypisierung erscheint daher sinnvoll, da logischerweise auch unterschiedliche Pathomechanismen wirken könnten. Dies kann eine frühe und exakte Diagnose vereinfachen, was sowohl die therapeutischen als auch die prognostischen Mittel positiv beeinflussen würde.

### **1.2.1 Endophänotypen**

Traditionelle Diagnosekriterien psychiatrischer Erkrankungen basieren gewöhnlich auf klinischen Parametern. Allerdings lässt die alleinige Betrachtung des klinischen Erscheinungsbildes eine objektive Diagnosefindung oftmals nur schwer zu. Da Gene ihre direkte Wirkung im Bereich der Zelle entfalten, ist es naheliegend, nach neurobiologischen Krankheitskorrelaten zu suchen, die besser mit den Ursachen der

psychiatrischen Erkrankung assoziiert sind als das klinische Erscheinungsbild. Die daraus entstehende Einteilung in sogenannte Endophänotypen oder intermediäre Phänotypen stellt somit eine Verknüpfung zwischen Genotyp und klinischem Phänotyp dar. Diese Endophänotypen erfassen sowohl Biomarker aus den Bereichen der Biochemie, Endokrinologie, Neurophysiologie und -anatomie als auch kognitive und neuropsychologische Messparameter.

### 1.2.2 Biomarker und Pathomechanismen

Biomarker lassen sich also in kognitive (neuropsychologische oder neurophysiologische) und fluide (v.a. proteomische und genetische) unterteilen. Im kognitiven Bereich sind insbesondere Tests zur Messung verschiedener neuropsychologischer Parameter [43],[44] sowie bildgebende Verfahren zum Nachweis neurophysiologischer Veränderungen von Bedeutung [45]. Weiterführende Informationen können den angegebenen Quellen entnommen werden.

Bzgl. der fluiden Biomarker wurden ebenfalls diverse Alterationen bei bipolaren Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen und v.a. zu differentialdiagnostisch relevanten Erkrankungen nachgewiesen. Sowohl in der Pathogenese als auch in der Therapie psychiatrischer Erkrankungen scheinen verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege von zentraler Bedeutung zu sein. So wurden, wie bereits im Zusammenhang mit DGKH als Risikogen erwähnt, Veränderungen im Phosphatidyl-Inositol-System beobachtet. Auch beeinflusst Lithium durch Inhibition der Inositolmonophosphatase die Signaltransduktion [46]. Der therapeutische Angriffspunkt von Lithium legt eine Dysregulation dieses Second-Messenger-Wegs bei bipolaren Patienten nahe. Außerdem sprechen einige Befunde für eine entscheidende Rolle des intrazellulären Kalziumhaushalts bei der Pathogenese. Kalzium kommt nicht zuletzt durch die Aktivierung der Schlüsselenzyme Proteinkinase C und Adenylatzyklase eine entscheidende Rolle in der Zellhomöostase zu. So fanden sich in lymphoblastoiden Zelllinien bipolarer Patienten z.T. erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentrationen [47] und einige in GWAS gefundene Risikogene, wie CACNA1C, codieren für Ionenkanäle. Ferner könnte die kalziumantagonistische Wirkung der Stimmungsstabilisatoren

Lithium, Valproat, Lamotrigin und Carbamazepin im Umkehrschluss einen möglichen Wirkmechanismus dieser Substanzen darstellen [48].

Besondere Aufmerksamkeit kam in den vergangenen Jahren dem Fachgebiet der Psychoneuroimmunologie zu, welches sich mit der wechselseitigen Interaktion von Immunsystem und Nervensystem befasst. Dabei könnten immunologische Prozesse zu psychiatrischen Störungen prädisponieren und psychopathologische Vorgänge könnten ihrerseits, durch Beeinflussung des Immunsystems, die Anfälligkeit für somatische Erkrankungen erhöhen. Auch der häufig schub- oder phasenhafte Verlauf stellt eine Gemeinsamkeit zwischen affektiven Störungen und Autoimmunerkrankungen dar. Darüber hinaus weisen ZNS und Immunsystem bemerkenswerter Weise die Besonderheit eines Gedächtnisses auf, was sie wohl von allen anderen Funktionssystemen des menschlichen Organismus unterscheidet. Auf molekularer Ebene stellt das Immunsystem des Menschen ein sensibles Gleichgewicht verschiedener Faktoren dar, welches je nach Bedarf angepasst werden kann. Viele Befunde weisen auf eine Störung dieses Gleichgewichts bei psychiatrischen Erkrankungen hin. Insbesondere bei affektiven Störungen wurde eine proinflammatorische Immunlage beobachtet. So scheint ein Übergewicht der Typ-1-Immunantwort zur gesteigerten Aktivierung von Monozyten und zur Ausschüttung von Akut-Phase-Proteinen und Zytokinen zu führen [49]. Den proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-6, IL-10 oder TNF- $\alpha$ , kommt dabei eine zentrale Rolle zu. Neben der Beeinflussung zentralnervöser Immunprozesse und der Regulierung der Blut-Hirn-Schranke nehmen sie, z.B. über Zytokinrezeptoren auf Nervenzellen, direkten Einfluss auf neuronale Prozesse. Des Weiteren konnten auch Zusammenhänge zwischen erhöhten IL-6-Plasmaspiegeln und verminderter Serotoninsynthese im ZNS, als ein depressionsauslösender Faktor, hergestellt werden [50].

Neueste Erkenntnisse deuten auf erhöhte IL-10-Serumkonzentrationen sowohl bei bipolarer Störung als auch bei Schizophrenie hin [51]. Für den Einfluss von Zytokinen auf molekulare Pathomechanismen psychiatrischer Erkrankungen spricht auch, dass Patienten unter Zytokintherapie, z.B. mit Interferon- $\alpha$  bei viraler Hepatitis, häufig als Nebenwirkung ein depressives Syndrom angeben. Ferner scheinen auch einige bzgl. psychiatrischer Erkrankungen relevante Stoffwechselwege durch Immunmechanismen

beeinflusst zu werden. So bewirkt die gesteigerte Typ-1-Immunantwort im Tryptophan-Kynurenin-Stoffwechselweg einen gesteigerten Tryptophanabbau, was zur Dysregulation im serotonergen System beitragen könnte, welches u.a. bei der Depression eine Rolle spielt [49]. Schließlich könnte auch die bei bipolaren Patienten hochregulierte Arachidonsäurekaskade von Bedeutung für die Suche nach immunologischen Biomarkern sein, da die Hochregulierung zu einem Anstieg von Prostaglandin E<sub>2</sub> und Zytokinen führt. Gestützt wird dies auch durch das Ansprechen depressiver Patienten auf selektive COX2-Inhibitoren, welche die Hemmung dieser Kaskade bewirken [52, 53]. Die Evidenzlage ist hierbei jedoch noch ungenügend und bedarf weiterer Untersuchungen.

Da auch neuroendokrinologische Pathomechanismen von Bedeutung zu sein scheinen, gilt es auch in diesem Bereich nach Biomarkern zu suchen. Insbesondere konnte eine erhöhte Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHN-Achse) bei Patienten mit bipolarer Erkrankung beobachtet werden. Dies wird im erhöhten basalen Kortisolspiegel und der verminderten Suppression im Dexamethason-Suppressionstest messbar. Zugleich fanden sich z.T. Veränderungen hippokampaler Glukokortikoidrezeptoren sowie eine Down-Regulation zentraler Glukokortikoidrezeptoren. Das mögliche Bestehen einer daraus resultierenden Steroidresistenz wird auch durch die Befunde von Rupprecht et al. [54] gestützt, dass trotz Hyperkortisolismus keine Cushing-Symptome auftreten. Andererseits weisen Patienten mit Cushing-Syndrom häufig ähnliche Symptome wie bei einer affektiven Störung, zum Beispiel Gedächtniseinbußen, gedrückte Stimmung, Libidoverlust oder Einschlafstörungen, auf [55]. Ferner scheint eine antidepressive Pharmakotherapie die Aktivität der HHN-Achse zu dämpfen. Somit könnten neuroendokrinologische Mechanismen nicht nur in Bezug auf Biomarker für diagnostische Zwecke, sondern auch für therapeutische Ansätze, wie bspw. die Antagonisierung von CRH- oder Glukokortikoid-Rezeptoren, von Bedeutung sein. Abschließend lässt sich noch anfügen, dass die HHN-Achse interessanterweise auch einer Modulation durch das Immunsystem unterliegt und Kortisol seinerseits natürlich eine bedeutende immunologische Stellgröße darstellt. Immuno peptide wie Interleukine oder Interferone beeinflussen die verschiedenen Ebenen des Hormonsystems, welches durch seine Mediatorrolle einen

weiteren möglichen Verknüpfungspunkt zwischen Immunsystem und Zentralnervensystem darstellt.

Des Weiteren wurde in den vergangenen Jahren nach Veränderungen im Bereich der adulten Neurogenese und der Umgestaltung von neuronalen Strukturen gesucht. Die rezeptorvermittelte Wirkung von Neurotransmittern und Neurotrophinen auf intrazelluläre Signalkaskaden ist hierbei von entscheidender Bedeutung für die neuronale Plastizität, v.a. für den Schutz existierender Neurone und der Bildung neuer Synapsen. Störungen in diesem Bereich könnten, sowohl in struktureller als auch in funktioneller Hinsicht, zu mangelnder Anpassungsfähigkeit an veränderte Umweltfaktoren führen. Diese Hypothese wird auch dadurch gestützt, dass Stimmungsstabilisatoren, wie Lithium und Valproat, neurotrophe und neuroprotektive Teilwirkungen zeigen [56, 57]. Niedrige Plasmakonzentrationen des Neurotrophins BDNF konnten u.a. bei Patienten mit bipolarer Störung nachgewiesen werden [58] und könnten somit als möglicher Biomarker der bipolaren Erkrankung in Betracht gezogen werden.

Schließlich konnte die Arbeitsgruppe um Bahn et al. durch Untersuchungen des Proteinprofils euthymer, bipolarer Patienten im Serum und in peripheren mononukleären Blutzellen mögliche Pathomechanismen der Erkrankung aufzeigen. So fanden sich intrazellulär v.a. Proteine des Zytoskeletts und der Stressantwort differentiell exprimiert. Dagegen sind die im Serum identifizierten Analyte, wie Fas-Ligand, CD40-Ligand, TNF- $\alpha$  oder verschiedene Chemokine, v.a. von Relevanz für das Immunsystem, was dessen Bedeutung bei der Pathogenese der bipolaren Erkrankung zusätzlich untermauert. Ferner ist den gefundenen Proteinen gemeinsam, dass sie über apoptotische Prozesse regulierend auf das Überleben von Zellen wirken [59].

Zusammenfassend lässt sich allerdings bemerken, dass der momentane Stand der Forschung noch keinen validen Einsatz von Biomarkern zur Diagnosestellung, zur Vorhersage von Therapieansprechen oder gar zur prognostischen Verlaufsbeurteilung erlaubt, was weitere Bemühungen auf diesem Gebiet notwendig macht.

### 1.3 Progranulin als möglicher Biomarker der bipolaren Störung

Progranulin stellt ein Protein dar, welches verschiedenste Vorgänge im menschlichen Organismus beeinflusst. In jüngster Vergangenheit wurde es im Rahmen der Suche nach möglichen Pathomechanismen und Biomarkern auch mit der bipolar affektiven Störung in Verbindung gebracht (s. Kapitel 1.3.4, [60]).

#### 1.3.1 Protein- und Genstruktur

Das Glykoprotein besteht aus 593 Aminosäuren und weist eine Molekülmasse von 88 kDa auf. Es beinhaltet eine sekretorische Signalsequenz und 7,5 Tandem-Repeats des Granulinrückgrats. Die Repeats enthalten jeweils zwölfmal die Aminosäure Cystein. Diese hochkonservierte Cysteinanordnung (s. Tab. 1.1) bildet das Fundament der Tertiärstruktur des Proteins. Die wesentliche biochemische Bedeutung kommt dabei der Thiolgruppe des Cysteins zu, welche die Bildung von Disulfidgruppen ermöglicht. Diese kovalente Bindung zweier Schwefelatome führt zur parallelen Anlagerung der cysteinhaltigen Tandemrepeats in sogenannte  $\beta$ -Hairpins und verleiht dem Protein seine Stabilität. Das Progranulingen (GRN) erstreckt sich über eine Länge von 3700 bp und liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 17 (17q21.31). Es enthält 13 Exons, wobei Exon 0 nicht-codierend ist [61].

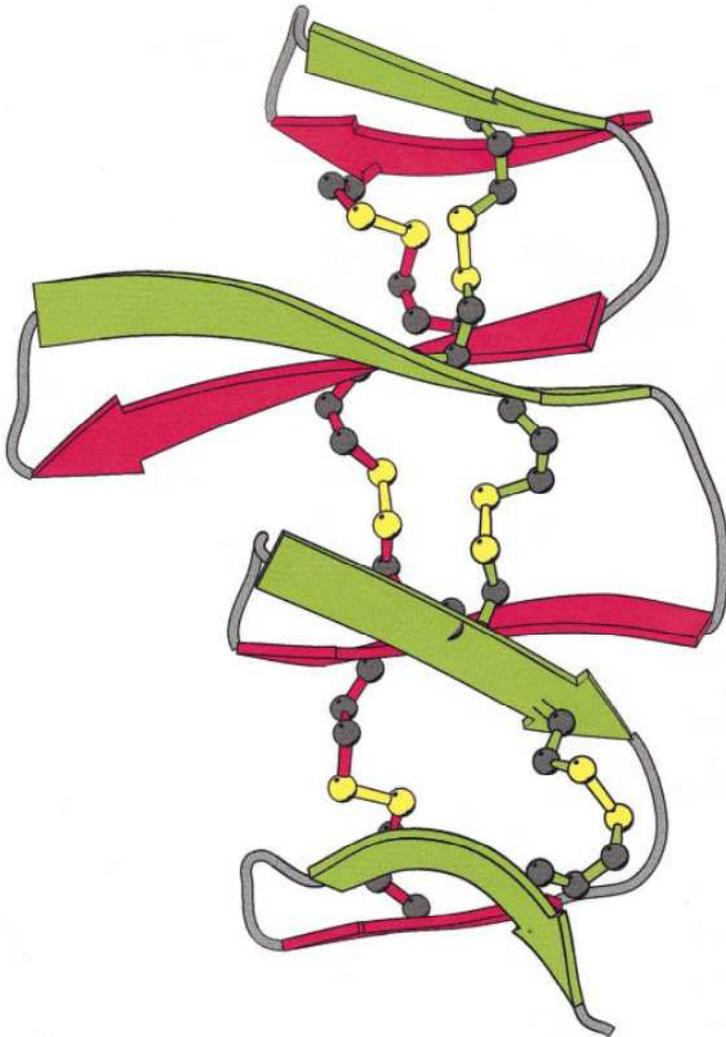
**Tab. 1.1: Evolutionäre Konservierung der Aminosäuresequenz verschiedener Granuline**  
(modifiziert nach Bateman et al. [62])

Granulin A ( <i>Mensch</i> )	C . DMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQ
Granulin B ( <i>Mensch</i> )	CPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLS
Granulin 1 ( <i>Karpfen</i> )	C . DAATI CPDGTTCCLSPYGVWYCCPF SMGQCCRDGIHCCRHGYHCDSTSTHCLR
PMP-D1 ( <i>Heuschrecke</i> )	C . . TEKTCPGTETCC TTPQGEEGCCPYKEGVCCLDGIHCCPSGTVCDEDHRRCIQ
Granulin 1 ( <i>C.elegans</i> )	C . DAETECSDDETCC KLGDN TWGCCPMPNAVCCDDRSHCCPTGTTCDPQGARCIG
Übereinstimmung	C-D----CPD--TCC-----G--GCCP-----CC-D--HCCP-----CD-----C--

### 1.3.2 Granuline

Die für Progranulin synonym verwendete Bezeichnung „Granulin-Precursor-Protein“ impliziert bereits die Eigenschaft des Progranulins als Vorläufer der Granuline, welche durch Spaltung des Granulinrückgrats entstehen. Die ca. 6kDa großen Fragmente bestehen aus 4 übereinander liegenden  $\beta$ -Hairpins, axial durch Disulfidbrücken verbunden und in einer linksgedrehten Superhelix angeordnet [62] (s. Abb. 1.2). Bisher konnten sieben verschiedene Granuline im Menschen identifiziert werden, wobei lediglich Granulin A, C und F eine für die Funktionalität bedeutsame wohldefinierte 3D-Struktur aufweisen [63]. Grundsätzlich sind sowohl Vorläufer als auch Endprodukt Proteine mit physiologischer Funktion. Auffällig ist dabei auch die Analogie in der Sekundär- und Tertiärstruktur zum Epidermalen Wachstumsfaktor (epidermal growth factor, EGF) bzw. dessen Vorläufer, trotz deutlicher Unterschiede in der Aminosäuresequenz. Dies könnte Ausdruck einer konvergenten Evolution verschiedenartiger Proteine als ähnliche Lösung eines gemeinsamen biologischen Problems sein. Eine vergleichbare Rezeptorwirkung auf gemeinsame Zielproteine könnte die Folge daraus sein [64] (s. Kapitel 4.1).

Bemerkenswerterweise findet sich dieses Motiv der hochkonservierten cysteinreichen Granulinstruktur nicht nur im Menschen, sondern lässt sich phylogenetisch sehr weit zurückverfolgen. Es konnten Granuline bei Wirbeltieren aller Klassen und auch bei Insekten und Nematoden nachgewiesen werden [65-68]. Selbst bei Pflanzen wurde eine Untereinheit einer Thiolprotease identifiziert, deren Cysteinanordnung eine erstaunliche Übereinstimmung zu den Granulinen aus Tiergewebe zeigte [69]. Die Entstehung des Granulin-Motivs scheint sich also bereits vor der Aufspaltung von Tier- und Pflanzenreich vollzogen zu haben. Dieses Erdzeitalter überdauernde Bestehen der Verbindung deutet also auf eine unentbehrliche Rolle in verschiedensten Organismen hin und könnte demnach einen weiteren Hinweis auf deren Bedeutung im Menschen darstellen.



**Abb. 1.2: Dreidimensionale Struktur des Granulin 1 beim Karpfen (entnommen aus [62])**

### 1.3.3 Funktion

Seit der Entdeckung der Proteinfamilie um 1990 durch Bateman et al. [70] und Shoyab et al. [71] wurde auch intensiv versucht, die Funktionen der Granuline und deren gemeinsamen Vorläufer Progranulin aufzuklären. Eine konstitutive Expression konnte v.a. in epithelialen Zellen, in mesenchymalen Immunzelllinien und in bestimmten Neuronen des Gehirns gefunden werden [72]. Insbesondere scheint nach dem heutigen Stand der Forschung Progranulin als eine Art autokriner Wachstumsfaktor das Zellwachstum zu regulieren. Dabei kommt ihm v.a. eine Rolle in der Tumorgenese, der Immunabwehr und Wundheilung, aber auch in neuronalen Prozessen zu. Eine Überexpression des Proteins wurde in verschiedenen Tumorentitäten, wie dem Nebennierenkarzinomen [73], dem Mammakarzinom [74] und schließlich in glialen

Tumoren des Gehirns [75], nachgewiesen, wobei ein stimulierender Effekt sowohl auf die maligne Transformation [76] als auch auf das Zellüberleben, die –proliferation und die –invasion beobachtet werden konnte [77]. Überdies beeinflusst Progranulin in physiologischer Weise die Wundheilung. Die Progranulin-mRNA-Expression wird dabei im entzündlichen Infiltrat, im Epithel und in dermalen Fibroblasten induziert, was zu einer Migration und Proliferation dieser Zellen und zum Einsprossen von Blutgefäßen ins geschädigte Gewebe führt [78].

#### 1.3.4 Mutationen im Progranulin-Gen

Während bei der Tumorgenese v.a. eine Überexpression des Gens von Bedeutung ist, können sich Mutationen auch auf ganz andere Weise auf die Physiologie des Menschen auswirken. Sowohl Baker et al. [79] als auch Cruys et al. [80] konnten 2006 zeigen, dass Nullmutationen im Progranulin-Gen ursächlich an der Entstehung der zweithäufigsten Early-onset-Demenz, der frontotemporalen Lobärdegeneration (FTLD), beteiligt sind. Die hierbei vorkommende Form der frontotemporalen Demenz, die FTLD-U, unterscheidet sich von der Pick-Krankheit durch das histologische Fehlen der intrazellulären tau-positiven Pick-Bodies und stattdessen durch das Vorkommen ubiquitin-positiver und TDP-43-positiver Zelleinschlüsse. Ubiquitin ist ein Protein, welches durch Anlagerung an andere Proteine bei deren Recycling eine Rolle spielt. Bei der FTLD-U kommt es zu pathologischen Ablagerungen des ubiquitinierten TDP-43. Eine Multicenter-Studie [81] konnte 2010 eine Einschätzung über die Frequenz der pathogenen GRN-Mutationen bei betroffenen Patienten geben. Im gesamten FTD-Spektrum wiesen 7% eine derartige Mutation auf, wohingegen 21% der ubiquitin-positiven Fälle Mutationen zeigten. Kam dabei noch eine positive Familienanamnese hinzu, waren es sogar 56%. Dies lässt darauf schließen, dass GRN-Mutationen insbesondere für die familiäre ubiquitin-positive Form der FTLD charakteristisch sind. Bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Pick-Krankheit, der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) oder der Multisystematrophie, konnte diese Anhäufung von Mutationen nicht beobachtet werden, obwohl bei den beiden letzteren ebenfalls eine TDP-43-Pathologie eine Rolle spielt.

Darüber hinaus konnte ein SNP in der 3'UTR-Region des Gens identifiziert werden, welcher ebenfalls das FTLD-U-Risiko erhöhte. Diese Region ist eine Bindungsstelle der microRNA-659 (MIR659), welche als Translationssuppressor fungiert. Funktionelle Studien zeigten, dass Mutationsträger eine erhöhte Bindungsrate aufwiesen, was einer Loss-of-function-Mutation des GRN gleichkommt. [82]. Ob Nonsense-Mutation, Deletion, Insertion oder Mutation an einer Splice Stelle, alle scheinen im Sinne eines Nullallels zum Verlust von 50% des funktionsfähigen Proteins zu führen, was eine Haploinsuffizienz des Progranulin-Gens als Ursache für die Entstehung einer FTLD nahelegt.

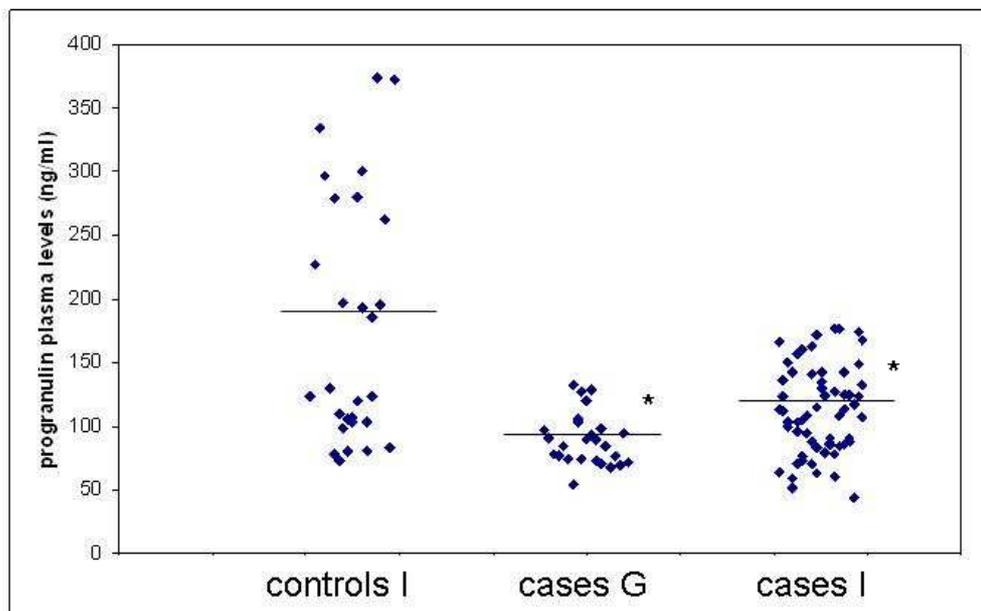
Ghidoni et al. [83] und Finch et al. [84] untermauerten die Hypothese der Haploinsuffizienz, indem sie Progranulinspiegel im Blutplasma bei GRN-Mutationsträgern im Vergleich zu Patienten oder gesunden Kontrollen ohne Mutation bestimmten. Sowohl bei gesunden Individuen als auch bei FTLD-Patienten wiesen die Mutationsträger drei- bis vierfach niedrigere Konzentrationen auf. Diese Werte sind somit niedriger als die durch Haploinsuffizienz zu erwartende Reduktion von 50%. Dies könnte dadurch begründet werden, dass die mutante mRNA die Expression der Wildtyp-mRNA negativ beeinflusst und somit den Nullalleleffekt verstärkt. Ein weiterer Grund könnte eine Dysbalance im GRN-Metabolismus und eine damit einhergehende verstärkte Umwandlung von Progranulin in Granuline sein.

Auf der Suche nach weiteren neuropsychiatrischen Erkrankungen, bei denen GRN-Risikogenvarianten zur Pathophysiologie beitragen könnten, fanden Galimberti et al. [60] kürzlich Auffälligkeiten bei der bipolaren affektiven Störung. Bei der Genotypisierung mehrerer SNPs im Progranulin-Gen bipolarer Patienten waren einige Allele signifikant häufiger vertreten als in gesunden Kontrollen (s. Tab.1.2). Darüber hinaus wurden auch hier die Progranulinkonzentrationen im Blutplasma bestimmt. Dies ergab zwar keine signifikanten Unterschiede als Folge der genetischen Varianz, jedoch deutlich erniedrigte Werte beim bipolaren Patientenkollektiv i. Ggs. zur Kontrollstichprobe ( $p < 0,001$ , s. Abb.1.3).

**Tab. 1.2: Genotyp-Häufigkeit bei bipolaren Patienten und gesunden Kontrollen**

(modifiziert nach Galimberti et al. [60])

SNP	n	Genotypverteilung in %		
		CC	CT	TT
<b>rs2879096</b>	Patienten	59,5	37,1	3,4
	Kontrollen	46,7	38,2	15,1 (p<0,001)
<b>rs4792938</b>	Patienten	48,5	43,9	7,6
	Kontrollen	38,5	43,6	17,9 (p<0,001)
<b>rs5848</b>	Patienten	48,5	41,3	10,2
	Kontrollen	39,9	46,5	13,6



**Abb. 1.3: Progranulin-Plasmakonzentrationen in bipolaren Patienten und Kontrollen (nach [60])**

I, Italienisch; G, Deutsch

## 1.4 Fragestellung

Betrachtet man die in Kapitel 1.1 umrissenen Grundlagen der bipolaren Störung, wird offenkundig, welcher großer Anteil der Erkrankung, insbesondere hinsichtlich des ätiologischen Hintergrunds und der Abgrenzung von anderen psychiatrischen Syndromen, immer noch im Dunkeln liegt. Dies erschwert sowohl differentialdiagnostische Überlegungen als auch therapeutische Ansätze. Um dieses Problem zu lösen, werden die Kriterien der Diagnosefindung immer mehr von klinischen Parametern auf das Feld der molekularbiologischen und kognitiven Biomarker erweitert. Die daraus entstehende Einteilung in sogenannte Endophänotypen soll durch die Verknüpfung von Genotyp und klinischem Phänotyp eine präzisere Diagnostik und demgemäß eine adäquate Therapie ermöglichen. Einen möglichen Biomarker der bipolaren Störung stellt das ubiquitär vorkommende Progranulin dar. Wie in Kapitel 1.3 erläutert, trägt es zu einer Vielzahl verschiedener Vorgänge im menschlichen Organismus wie der Entstehung neuropsychiatrischer Erkrankungen bei. Im Folgenden soll insbesondere die Beteiligung an der bipolaren Störung untersucht werden. Die Ergebnisse von Galimberti et al. [60] wiesen bereits eine erhöhte Frequenz verschiedener Allele und signifikant niedrigere Progranulinspiegel bei bipolaren Patienten nach, entbehren dabei aber noch ausreichend großer Fallzahlen. Vorrangiges Ziel dieser Arbeit soll sein, diese Ergebnisse zu verifizieren, indem die Progranulin-Plasmaspiegel anhand einer größeren Fall-Kontroll-Gruppe bestimmt werden. Als weiteres Ziel soll die Assoziation auf genetischer Ebene bestätigt werden. Dafür wurden die Probanden bzgl. der in Tab.1.2 aufgeführten SNPs genotypisiert. Ferner sollen die gemessenen Progranulinkonzentrationen hinsichtlich verschiedener Parameter, wie Alter, Geschlecht oder Genotyp, untergliedert und verglichen werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Stichprobe**

Als Ausgangsmaterial zur Messung der Progranulinkonzentration mittels ELISA diente Blutplasma. Die Blutentnahme, bei der u.a. das Plasma zur Progranulinbestimmung entnommen wurde, fand bei den Probanden im nüchternen Zustand zwischen 7 und 11 Uhr vormittags statt.

Es wurde eine Stichprobe von 104 Patienten mit bipolarer affektiver Störung rekrutiert, davon 56 Frauen und 48 Männer. Des Weiteren kann die Stichprobe in 64 Bipolar-I- und 40 Bipolar-II-Erkrankte unterteilt werden. Das Durchschnittsalter  $\pm$  SD betrug  $48,1 \pm 12,56$  Jahre, mit einer Altersspanne von 20 bis 76 Jahren.

Die Stichprobe der Kontrollpersonen umfasste 80 Individuen, darunter 46 Frauen und 34 Männer. Hier lag das Durchschnittsalter  $\pm$  SD bei  $37,7 \pm 13,93$  Jahren, mit einer Spanne von 20 bis 71 Jahren. Somit ist es signifikant niedriger als das der Patienten.

Es wurden lediglich Personen kaukasischer Herkunft in die Studie eingeschlossen, um eine homogene Stichprobe in Bezug auf die Ethnie zu erhalten. Euthyme Stimmungslage bzw. Symptombefreiheit waren kein obligates Einschlusskriterium. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme zeigten 48 der 104 Patienten eine euthyme, 26 eine depressive, sieben eine hypomanische, zwei eine manische, acht eine manisch-psychotische, sieben eine gemischte, einer eine gemischt psychotische und drei eine Stimmungslage vom Rapid Cycling Typ. Bei zwei Patienten ist die Phase zum Zeitpunkt der Blutentnahme unbekannt.

Ausschlusskriterien stellten Minderjährigkeit und schwere internistische Erkrankungen, wie bspw. bestehende maligne Tumorerkrankungen, eine schwere Herzinsuffizienz oder chronische Infektionen mit HBV, HCV oder HIV dar.

Auf die Durchführung der Rekrutierung soll im Kapitel 2.2.1 im Einzelnen eingegangen werden.

### 2.1.2 ELISA-Kit

Zur Durchführung des Immunoassays wurde das Progranulin (human) ELISA Kit von Adipogen (Incheon, Korea) verwendet. Als gebräuchliches und von kooperierenden Instituten verwendetes Kit wurde es denen anderer Hersteller vorgezogen, um eine bessere Vergleichbarkeit der Daten mit der von Galimberti et al. untersuchten Stichprobe zu gewährleisten. Folgende Komponenten waren im Kit enthalten:

**Tab. 2.1: Komponenten des Progranulin ELISA Kits**

Progranulin-Standard (lyophilisiert)
Progranulin-Sample als Qualitätskontrolle (lyophilisiert)
Polyklonaler Detektions-Antikörper (biotinyliert)
Detektor 100x (HRP-markiertes Streptavidin)
Substrat (Tetramethylbenzidin)
Phosphorsäure zum Abstoppen der Reaktion
Waschpuffer 10x
Diluent 5x (Verdünnungsmittel)
96-Well-Mikrotiterplatte (beschichtet mit Progranulin-Antikörper)
Plastikfolie zum Versiegeln

### 2.1.3 Gebrauchs- und Verbrauchsgegenstände

**Tab. 2.2: Gebrauchs- und Verbrauchsgegenstände mit Hersteller**

Messzylinder 50-1000 ml	Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland
Glasflaschen 250-1000 ml	Schott Duran, Mainz, Deutschland
Falcon Röhrchen Cellstar® Tubes 15 ml/50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pipetten 10, 20, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Elektronische Pipette Finnpipette® 30-300 µl	Thermo Scientific, Waltham, USA
Multipipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipette	Boeco, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Combitips für Multipipette 1 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Protein LoBind® Tubes 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
S-Monovette® EDTA K <sub>2</sub> -Gel	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland

#### 2.1.4 Geräte

**Tab. 2.3: Verwendete Geräte mit Typenbezeichnung und Hersteller**

Reinstwasseraufbereitungssystem	NANOpureDiamond™	Thermo Scientific, Waltham, USA
Vortex-Mixer	Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Spektrophotometer	Multiskan® Spectrum Microplate Spectrophotometer	Thermo Scientific, Waltham, USA
Multi-Reagenz-Waschgerät	GB-3285	Dynatech Laboratories, El Paso, USA
Zentrifuge	Megafuge 1.OR	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Inkubator 37°C	B-5042 E	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

#### 2.1.5 Software

**Tab. 2.4: Verwendete Software**

Microsoft® Excel® 2000
Microsoft® Excel® 2007
Multiskan® Spectrum Software
IBM® SPSS® Statistics 20
Haploview 4.2

#### 2.1.6 Sonstiges

**Tab. 2.5: Sonstige verwendete Materialien**

Entionisiertes Wasser	Merck, Darmstadt, Deutschland
-----------------------	-------------------------------

## 2.2 Methodik der Materialgewinnung

### 2.2.1 Versuchspersonenrekrutierung

Die Rekrutierung der Patienten und Kontrollen erfolgte ausnahmslos an der Klinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie des Universitätsklinikums Würzburg. Ausschließlich Individuen, die ihr schriftliches Einverständnis gaben, wurden in die Studie aufgenommen. Diese steht im Einklang mit der Deklaration von Helsinki und wurde durch die Ethikkommission der Universität Würzburg bewilligt.

Es wurden sowohl ambulante als auch stationäre, sowie Patienten, die zu einem früheren Zeitpunkt in stationärer Behandlung gewesen waren, in die Studie aufgenommen. Bei allen war zuvor eine bipolare affektive Störung durch zwei Fachärzte für Psychiatrie und Psychotherapie gemäß ICD-10 unabhängig voneinander diagnostiziert worden. Um an der Studie teilnehmen zu können, mussten die Versuchspersonen psychisch und physisch in der Lage sein, ihr Einverständnis zur Teilnahme zu geben. Sie wurden darüber hinaus über Ablauf, Dauer, Bedeutung und mögliche Risiken der Studie aufgeklärt.

Voraussetzung war außerdem eine vorhergehende Nüchternheit von zwölf Stunden. Daher erfolgte die Blutentnahme einheitlich morgens / vormittags, wodurch als positiver Nebeneffekt ein evtl. Fehler durch zirkadiane Veränderungen im Progranulinspiegel ausgeschlossen werden konnte.

Des Weiteren wurde vor jeder Blutentnahme eine psychometrische Untersuchung mittels *Montgomery Asberg Depression Scale (MADRS)* sowie *Young Mania Rating Scale (YMRS)* durchgeführt, um die momentane Krankheitsphase des Patienten zu dokumentieren. Bei den Kontrollpersonen wurde zum Ausschluss jeglicher psychiatrischer Erkrankungen ein diagnostisches Kurzinterview (*Mini-DIPS*) geführt.

31 der 104 Patienten, die früher bereits an einer Studie im Haus teilnahmen und einer erneuten Kontaktierung zugestimmt hatten, wurden ohne direkten Zusammenhang zu einer aktuellen Behandlung kontaktiert und in die Klinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie eingeladen an der Studie teilzunehmen. Bei dieser Gruppe wurden zusätzlich zu MADRS und YMRS noch ein *Fragebogen zum Chronotyp (D-MEQ)*, das *Beck-Depressions-Inventar (BDI II)* sowie ein *Fragebogen zum individuellen Schlafverhalten* durchgeführt.

### 2.2.2 Blutentnahme und Aliquotierung des Plasmas

Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten nach den Richtlinien zur Verarbeitung von Patientenproben der „PsyNova“ des „Cambridge Centre for Neuropsychiatric Research“. Die Blutentnahme wurde mit Hilfe von EDTA K<sub>2</sub>-Gel Monovetten durchgeführt. Dikalium-EDTA dient durch Bindung von Kalzium als Antikoagulans. Blutplasma wurde aus verschiedenen Gründen einer Bestimmung aus Serum vorgezogen. Zum einen werden gerinnungsbedingte Veränderungen des Mediums vermieden, wodurch dieses Verfahren somit wohl eher den *in vivo*-Bedingungen entspricht. Zum anderen fand Plasma als Medium für die Progranulinbestimmung in vorangegangenen Publikationen bereits Verwendung und ist daher breit evaluiert. Pro Patient wurden 9 ml Blut entnommen, worauf es bei 4°C maximal eine Stunde gelagert wurde. Die darauf folgende Zentrifugation erfolgte bei 2300 rpm über 15 Minuten bei ebenfalls 4°C. Nach Zentrifugation entsteht ein nahezu zellfreier Überstand, der in Lobind® Tubes zu je 0,5 ml aliquotiert und direkt der Lagerung bei -80°C zugeführt wurde.

## 2.3 Methodik des Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA)

### 2.3.1 Grundlagen des ELISAs

Der Enzyme Linked Immunosorbent Assay stellt ein molekularbiologisches Nachweisverfahren dar. Da er auf der spezifischen Bindung von Antikörpern beruht und mit Hilfe einer enzymatischen Reaktion einen Farbumschlag hervorruft, wird er zu den enzymatischen Immunadsorptionsverfahren (EIA) gezählt. Er findet v.a. breite Anwendung beim Nachweis von Proteinen, z.B. Antikörpern bei Infektionskrankheiten oder Blutplasmabestandteilen, wie z.B. dem Progranulin. Auch ist es möglich, Viren direkt nachzuweisen, so z.B. bei HIV-Tests neuerer Generation. Des Weiteren ist der ELISA beim Nachweis niedermolekularer Verbindungen von Bedeutung. So findet er Anwendung in Testverfahren auf Allergene, Toxine, aber auch Medikamente im Rahmen von Screening-Verfahren. Als Medium können verschiedenste Substanzen wie Blutplasma, Serum, Speichel, Muttermilch, Urin oder auch Zellkulturüberstand dienen.

Das für die Progranulinbestimmung gebräuchliche Verfahren ist der sogenannte Sandwich-ELISA, auf den im Folgenden noch näher eingegangen werden soll (s.2.3.3). Andere Formen des ELISAs sind bspw. der kompetitive oder auch der indirekte ELISA.

### 2.3.2 Vorbereitung des ELISAs

Zur Vorbereitung des ELISAs wurde zuerst die gewünschte Arbeitskonzentration von Waschpuffer und Verdünnungsmittel hergestellt. So wurde mit 50 ml Waschpuffer 10x und 450 ml entionisiertem Wasser eine 1:10 Verdünnung hergestellt, 50 ml Diluent 5x wurde mit 200 ml entionisiertem Wasser 1:5 zu Diluent 1x verdünnt.

Ferner wurden Progranulin-Standard und die Qualitätskontroll-Probe mit 1 ml entionisiertem Wasser rekonstituiert. Beide Reagenzien mussten daraufhin mindestens 15 Minuten ruhen. Durch die Rekonstitution entstand eine Progranulin-Standard-Konzentration von 8 ng/ml, die als Ausgangspunkt für die Verdünnungsreihe der Standardkurve diente, welche wie folgt hergestellt wurde.

**Tab 2.6 Herstellung der Standard-Verdünnungsreihe**

<b>Gewünschte Konzentration</b>	<b>Benötigte Menge an Standard</b>	<b>Benötigte Menge an Diluent</b>
4 ng/ml	300 µl Progranulin (8 ng/ml)	300 µl Diluent 1x
2 ng/ml	300 µl Progranulin (4 ng/ml)	300 µl Diluent 1x
1 ng/ml	300 µl Progranulin(2 ng/ml)	300 µl Diluent 1x
0,5 ng/ml	300 µl Progranulin(1 ng/ml)	300 µl Diluent 1x
0,25 ng/ml	300 µl Progranulin(0,5 ng/ml)	300 µl Diluent 1x
0,125 ng/ml	300 µl Progranulin(0,25 ng/ml)	300 µl Diluent 1x
0,063 ng/ml	300 µl Progranulin(0,125 ng/ml)	300 µl Diluent 1x
0 ng/ml (Blank)	-	300 µl Diluent 1x

Um eine Standardkurve hoher Güte zu erhalten, war ein kurzes „Vortexen“ der jeweiligen Verdünnung nötig, bevor wiederum ein Teil für die nächste Verdünnungsstufe entnommen wurde. Da das Reaktionskit eine optimale Sensitivität nur im Bereich der Standardkurve von 0,063 ng/ml bis 4 ng/ml gewährleistete und die zu erwartenden Progranulinspiegel bei etwa 50 – 400 ng/ml lagen [84], mussten die Plasmaproben ebenfalls verdünnt werden. Anhand einer Patientenprobe wurde eine Verdünnungsreihe durchgeführt, um das ideale Verhältnis von Plasma und Diluent zu erlangen. Daraufhin wurde bei der Durchführung des ELISAs eine 1:200 Verdünnung gewählt. 5 µl Plasma wurden mit 995 µl Diluent verdünnt und anschließend kurz „gevortext“.

### 2.3.3 Durchführung des ELISAs

Als Veranschaulichung des im folgenden Abschnitt beschriebenen Vorgangs soll Abbildung 2.1 dienen. Für die Durchführung des Sandwich ELISAs wurden 96-Well-Mikrotiterplatten verwendet, welche mit polyklonalen Antikörpern gegen Progranulin beschichtet waren. Darauf wurde je Well 100 µl Standard, Qualitätskontroll-Probe bzw. verdünntes Plasma pipettiert. Bei der Standardreihe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Bei Plasmaproben wurde, bis auf die letzten zwei Wells der Platte und einigen Wiederholungsmessungen, die zweifach gemessen wurden, eine Dreifachbestimmung durchgeführt (vgl. Tab. 2.7). Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass auf jeder Mikrotiterplatte sowohl Patienten- als auch Kontrollproben gemessen wurden, um einen Batch-Fehler zu vermeiden.

**Tab. 2.7 Beispielschema einer 96-Well-Mikrotiterplatte:**

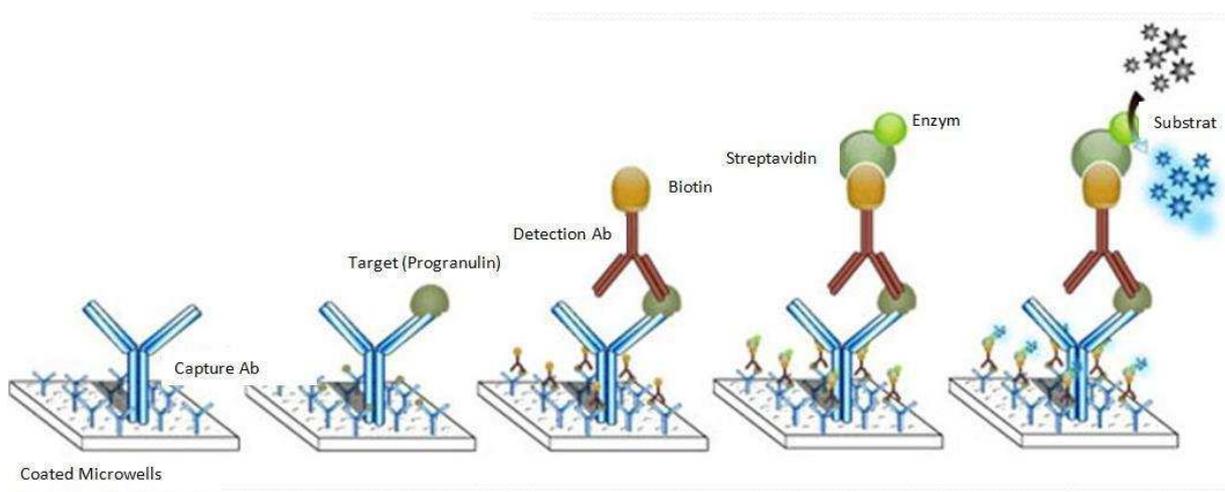
S Standard, QC Qualitätskontroll-Probe, P Patientenprobe, K Kontrollprobe

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S 4 ng/ml		QC			P8			K1			K 10
B	S 2 ng/ml		P1			P9			K2			
C	S 1 ng/ml		P2			P10			K3			
D	S 0,5 ng/ml		P3			P11			K4			K 11
E	S 0,25 ng/ml		P4			P12			K5			
F	S 0,125 ng/ml		P5			P13			K6			
G	S 0,063 ng/ml		P6			P14			K7			K 12
H	Blank		P7			P15			K8			

Daraufhin wurde die Platte mit Folie versiegelt, um die Wells vor Austrocknung zu schützen und anschließend bei 37°C eine Stunde inkubiert. In dieser Zeit sollte das enthaltene Progranulin vollständig an den festphasengekoppelten primären Antikörpern binden. Als nächstes folgte ein Waschschrift, um jegliche ungebundene Bestandteile zu entfernen. Dabei wurde mit Hilfe eines Multireagenz-Waschgeräts die Flüssigkeit in jedem Well abgesaugt und mit 300 µl Waschpuffer gespült. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Vollständige Entfernung der Flüssigkeit war essentiell für ein gutes Ergebnis. Nun wurden unter Verwendung einer Multipipette in jedes Well 100 µl des Detektionsantikörpers gegeben. Dieser sekundäre Antikörper bindet spezifisch an ein anderes Epitop des Progranulins als der primäre Antikörper. An seinem Fc-Stück ist Biotin kovalent gebunden, welches später für die Bindung zum Detektor von Bedeutung ist.

Auf diesen Schritt folgten dann wieder das Versiegeln und eine Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C. Währenddessen wurde aus der Detektorlösung die gewünschte Arbeitskonzentration hergestellt, indem 120 µl Detektor 100x mit 11,88 ml Diluent 1x um den Faktor 1:100 verdünnt wurden. Der Detektor bestand aus Streptavidin und dem Enzym Meerrettichperoxidase, welches später die Umwandlung des Substrats katalysiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit schloss sich wieder der oben beschriebene dreimalige Waschzyklus an. Dadurch wurden die ungebundenen Bestandteile wieder entfernt und zurück blieb das an den primären und sekundären Antikörper gebundene Progranulin. Anschließend wurden 100 µl der Detektorverdünnung zu jedem Well hinzugefügt und nach Versiegeln eine Stunde inkubiert. In dieser Zeit kommt es zur Bindung des Detektors an den sekundären Antikörper. Dabei kommt die Rolle von Biotin und Streptavidin als „Vermittler“ zwischen sekundärem Antikörper und Meerrettichperoxidase maßgeblich zum Tragen. Streptavidin ist ein Protein, dessen vier Untereinheiten mit sehr hoher Affinität jeweils eine nichtkovalente Bindung zu Biotin eingehen [85]. Somit entsteht eine sehr stabile und zugleich in einem festen Verhältnis vorliegende Bindung, was man sich zum Nachweis von Antigenen bei verschiedensten Detektionsverfahren zu Nutze macht. Daraufhin folgte der letzte Waschzyklus, welcher fünfmal wiederholt wurde, um keinerlei Verfälschungen auf Grund von Rückständen des ungebundenen Detektors zu erlauben.

Schließlich wurde in jedes Well 100  $\mu$ l Tetramethylbenzidin als Substrat hinzugefügt. Die Enzym-Substrat-Reaktion vollzog sich bei Raumtemperatur im Dunkeln, wobei nach 10 Minuten die Reaktion durch Zugabe von 100  $\mu$ l Phosphorsäure beendet wurde. Je nach Menge an vorhandener Meerrettichperoxidase bildet Tetramethylbenzidin (TMB) ein blaues Produkt, worauf nach Abstoppen der Reaktion ein gelblicher Farbkomplex entsteht. Um den Farbumschlag quantitativ erfassen und somit auf die vorhandene Progranulinmenge schließen zu können, wurde innerhalb von 30 Minuten die Absorption bei 450 nm mittels Spektrophotometer gemessen.



**Abb.2.1: Schema zum Progranulin-Sandwich-ELISA**

(modifiziert nach [http://www.epitomics.com/images/products/sandwich\\_dual.jpg](http://www.epitomics.com/images/products/sandwich_dual.jpg))

## 2.4 Methodik der Genotypisierung

Überdies wurde bei 102 Patienten und 79 Kontrollen der unter 2.1.1 beschriebenen Kohorte am Institut für Neurowissenschaften der Universität Mailand, Italien eine Genotypisierung der früher als mit der bipolaren Störung assoziiert gefundenen Polymorphismen rs2879096, rs4792938 und rs5848 durchgeführt. Die ersten beiden SNPs liegen in zentralen Anteilen des Progranulin-Gens. Rs5848 ist in der 3'UTR-Region lokalisiert und beeinflusst nach neueren Untersuchungen die posttranskriptionelle Bildung des Progranulins durch microRNA-659-Regulation [82]. Galimberti et al. konnten kürzlich nachweisen, dass bei diesen drei SNPs ein

signifikanter Unterschied in der Verteilung bei bipolaren Patienten und Kontrollen besteht [60].

## **2.5 Statistische Analyse**

Die statistische Auswertung erfolgte mittels IBM® SPSS® Statistics 20.

Unterschiede in den Progranulinkonzentrationen zwischen Fall- und Kontrollgruppe wurden unter Einbeziehung der Kovariaten „Geschlecht“ mittels Kovarianzanalyse (ANCOVA) auf Signifikanz geprüft. Dadurch konnte die Fehlervarianz von der durch das Geschlecht verursachten Varianz bereinigt und somit die Power der Analyse erhöht werden. Eine einseitige Testung war dabei möglich, da man auf Grund von zuvor publizierten Daten [60] davon ausgehen konnte, dass Patienten im Mittel einen niedrigeren Progranulinspiegel als Kontrollen aufweisen. Post Hoc wurde der ANOVA-äquivalente T-Test durchgeführt. Außerdem wurde auf eine Korrelation nach Pearson zwischen Alter und Progranulinspiegel der Individuen getestet.

Genotyp- und Allelfrequenzen der Polymorphismen rs2879096, rs4792938 und rs5848 konnten durch direktes Auszählen ermittelt und mittels Chi<sup>2</sup>-Test konnten Fall- und Kontrollgruppe verglichen werden. Ferner wurde Haploview 4.2 dazu verwendet, auf unterschiedliche Haplotypenverteilung zu testen, wobei ebenfalls mittels Chi<sup>2</sup>-Test die beiden Gruppen verglichen wurden.

Schließlich sollte auch der Einfluss bestimmter Genotypen der jeweiligen SNPs auf den Progranulinspiegel im Blutplasma geprüft werden, indem eine univariate Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt wurde.

### **3 Ergebnisse**

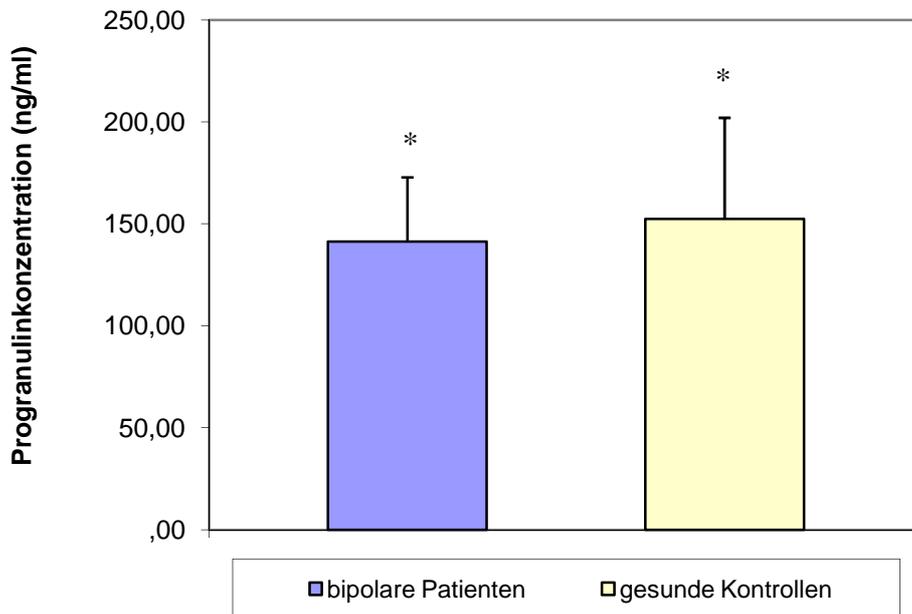
#### **3.1 Progranulinkonzentrationen von Patienten und Kontrollen**

Basierend auf der Hypothese, dass sich Progranulinkonzentrationen bei bipolaren Patienten im Durchschnitt auf einem niedrigeren Niveau befänden, wurde ein ELISA durchgeführt, um diesen Sachverhalt zu replizieren. Im Patientenkollektiv (n=104) ergab sich eine mittlere Progranulinkonzentration von 141,29 ng/ml bei einer Standardabweichung von 31,50 ng/ml. Die Werte bewegten sich zwischen 77,11 ng/ml und 273,89 ng/ml. Die Kontrollen (n=80) wiesen dagegen im Mittel eine höhere Konzentration von 152,41 ng/ml auf. Die Werte waren hier auch breiter gestreut, was sich in der größeren Standardabweichung von 49,56 ng/ml widerspiegelt. Minimum und Maximum betragen hier 45,27 ng/ml und 292,48 ng/ml.

Zur statistischen Analyse der Werte wurde eine ANCOVA mit der Kovariate „Geschlecht“ durchgeführt, welche einen Unterschiedstrend zwischen Patienten und Kontrollen ergab ( $F(1, 181)=3,38, p=0,068$ ). Da die Hypothese jedoch einen niedrigeren Progranulinspiegel bei Patienten vorhersagt und somit eine bestimmte Richtung vorgibt, konnte der p-Wert der zweiseitigen Testung in einen einseitigen p-Wert von 0,034 umgewandelt werden. Somit wurde ein signifikantes Niveau kleiner 0,05 erreicht. Die Kovariate „Geschlecht“ nimmt hingegen keinen Einfluss auf die Progranulinkonzentration ( $F(1, 181)=0,070, p=0,792$ ).

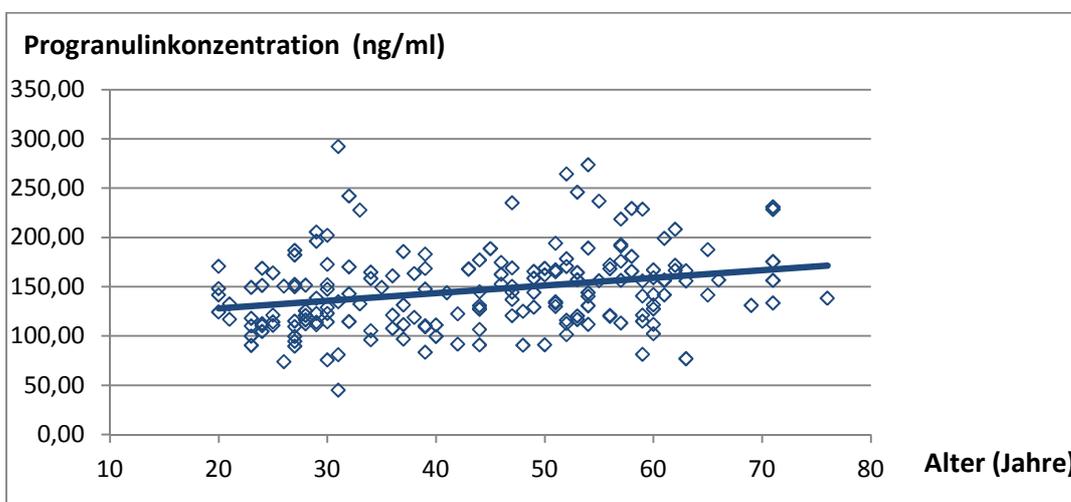
Der im Anschluss durchgeführte Post-Hoc-T-Test ergab ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen ( $t(182)=-1,753, p=0,041$ (einseitig)).

Abbildung 3.1 dient zur Veranschaulichung der dabei gewonnenen Ergebnisse.



**Abb. 3.1: Progranulinkonzentrationen und Standardabweichungen bei Patienten und Kontrollen**

Ferner wurde die Korrelation zwischen Progranulinspiegel und Alter der Individuen untersucht. Es ergab sich, dass das zunehmende Alter der Individuen mit steigenden Progranulinspiegeln hochsignifikant korrelierte ( $p < 0,001$ ) (vgl. Abb. 3.2). Auf Grund der signifikant divergierenden Altersmittel der Fall- bzw. Kontrollgruppe muss dieser Sachverhalt bei der Auswertung der Daten Beachtung finden (s. Kapitel 4.2).



**Abb. 3.2: Altersabhängigkeit des Progranulinspiegels im Blutplasma**

Das Patientenkollektiv wurde außerdem in Subgruppen unterteilt und auf unterschiedliche Progranulinspiegel mittels univariater ANOVA und post-hoc T-Test untersucht. Dabei konnte aber weder bei der Differenzierung nach Bipolar Typ-I und -II ( $F=1,6$ ,  $p=0,2$ ), noch nach den momentanen Phasen bei Blutentnahme ( $F<1$ ) ein signifikanter Unterschied gefunden werden. Dies kann jedoch auch in der ungenügenden Größe der jeweiligen Subgruppen und somit in der zu geringen Power der Analyse begründet liegen.

### **3.2 Genotypisierung der GRN-Polymorphismen**

Darüber hinaus wurde die Stichprobe des Immunoassays bzgl. der Polymorphismen rs2879096, rs4792938 und rs5848 genotypisiert.

Mittels Chi<sup>2</sup>-Test wurde nun die Genotypverteilung auf mögliche Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen untersucht. Die dabei ermittelte Diskrepanz erreichte aber in keinem der drei Fälle Signifikanzniveau. rs2879096 wies in beiden Gruppen nahezu gleiche Verteilung auf ( $\text{Chi}^2=0,243$ ,  $p=0,886$ ). Bei rs4792938 und rs5848 ließ sich bei den bipolaren Patienten eine leichte Verschiebung zu Gunsten des Wildtyps mit Abnahme des heterozygoten Anteils erkennen, jedoch ohne signifikante Aussagekraft (rs4792938:  $\text{Chi}^2=0,996$ ,  $p=0,608$ , rs5848:  $\text{Chi}^2=1,465$ ,  $p=0,481$ ).

Eine Übersicht der prozentualen und absoluten Verteilung und die errechneten p-Werte sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

**Tab. 3.1: Genotypenverteilung bei bipolaren Patienten und gesunden Kontrollen**

(<sup>a</sup>:p=0,886, <sup>b</sup>:p=0,608, <sup>c</sup>:p=0,481)

SNP	n	Genotypverteilung in % (n)		
<b>rs2879096<sup>a</sup></b>		<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>
	Patienten	102	59,8 (61)	32,4 (33)
Kontrollen	79	63,3 (50)	29,1 (23)	7,6 (6)
<b>rs4792938<sup>b</sup></b>		<b>GG</b>	<b>GC</b>	<b>CC</b>
	Patienten	102	54,9 (56)	33,3 (34)
Kontrollen	79	49,4 (39)	40,5 (32)	10,1 (8)
<b>rs5848<sup>c</sup></b>		<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>
	Patienten	102	48,0 (49)	44,1 (45)
Kontrollen	79	40,5 (32)	53,2 (42)	6,3 (5)

Überdies wurde auch nach Unterschieden in der Haplotypenverteilung der beiden Gruppen gesucht. Da lediglich rs2879096 und rs4792938 auf einem gemeinsamen Haploblock liegen, konnten nur diese beiden SNPs in die Berechnungen eingeschlossen werden. Rs5848 befindet sich im Bereich eines anderen Haploblocks und wie bereits oben erwähnt nicht im Progranulingen, sondern in dessen 3'UTR-Region. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist die Verteilung der vorkommenden Haplotypen in Tabelle 3.2 dargestellt. Es ergaben sich auch hier bei keinem der Haplotypen signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen.

**Tab. 3.2: Haplotypenverteilung bei bipolaren Patienten und gesunden Kontrollen**

Allel		Frequenz		Chi <sup>2</sup>	p-Wert
rs2879096	rs4792938	Bipolar	Kontrollen		
C	G	0,700	0,696	0,01	0,921
T	C	0,225	0,221	0,008	0,928
C	C	0,059	0,083	0,758	0,384

### 3.3 Auswirkungen der GRN-Polymorphismen auf den Progranulinspiegel

Neben der getrennten Untersuchung der Progranulinspiegel bzw. der GRN-Polymorphismen sollten diese beiden Parameter nun auch in Beziehung gesetzt werden. Die Fragestellung dabei lautete, ob bestimmte Genotypen der drei getesteten Polymorphismen die Progranulinkonzentration im Blutplasma beeinflussen. Die dafür durchgeführte Varianzanalyse (ANOVA) fand jedoch bei keinem der drei getesteten SNPs einen Genotyp, der mit signifikant veränderten Plasmaspiegeln vergesellschaftet war (rs2879096:  $F(2,167)=0,211$ ,  $p=0,810$ ; rs4792938:  $F(2,167)=0,242$ ,  $p=0,785$ ; rs5848:  $F(2,167)=0,717$ ,  $p=0,490$ ).

Daraufhin wurde die Patientengruppe separat auf diesen Zusammenhang untersucht. Hierbei war auf Grund der kleinen Gruppen keine Normalverteilung der Daten gegeben, weshalb eine nonparametrische Testung anstelle einer Varianzanalyse erfolgte. Bei den beiden im Progranulingen liegenden SNPs rs2879096 und rs4792938 fanden sich dabei keine signifikanten Unterschiede. Der in der 3'UTR-Region lokalisierte Polymorphismus rs5848 wies hingegen genotypspezifische Unterschiede auf. Interessanterweise zeigten sich beim mutanten Allel T/T signifikant niedrigere Progranulinspiegel als bei Wildtyp- und heterozygotem Allel (s. Tab. 3.3). Die mittels Kruskal-Wallis-Test errechneten Unterschiede ergaben ein  $\text{Chi}^2(2)=8,97$  und eine asymptotische Signifikanz  $p=0,011$ . Als nonparametrischer post-hoc Test wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Zwischen C/C und C/T war dabei kein signifikanter Unterschied zu erkennen ( $\text{Chi}^2<1$ ), wohingegen die Unterschiede zwischen C/C und T/T ( $p=0,003$ ) sowie zwischen C/T und T/T ( $p=0,005$ ) signifikant waren.

**Tab. 3.3: Auswirkungen von rs5848 auf die Progranulinkonzentration bei Patienten**

rs5848	n	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (ng/ml)
C/C	49	145,45 $\pm$ 32,89
C/T	45	142,20 $\pm$ 28,78
T/T*	8	108,44 $\pm$ 24,33

## 4 Diskussion

### 4.1 Progranulinmangel als Pathomechanismus der bipolaren Erkrankung

Betrachtet man die Ergebnisse der Progranulinbestimmung mittels ELISA, wurden bei bipolaren Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant niedrigere Konzentrationen beobachtet. Dabei stellt sich natürlich die Frage, welchen pathophysiologischen Stellenwert diese erniedrigten Progranulinspiegel bzgl. der bipolaren Störung haben. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, spielen immunologische und entzündliche Vorgänge bei psychiatrischen Erkrankungen eine Rolle, wobei die Familie der Granuline auf eben diese Prozesse scheinbar regulierend einwirkt. Zhu et al. [86] konnten 2002 erstmals nachweisen, dass die Granuline eine Art Gegenspieler zu ihrem Vorläufer Progranulin darstellen. Granuline führen u.a. durch Stimulation der IL-8-Sekretion zur Neutrophilenaggregation, zur Degranulation und zur Freisetzung reaktiver Spezies und fördern dadurch inflammatorische Prozesse. Das Vorläuferprotein Progranulin wirkt hingegen durch Inhibition dieser Prozesse antiinflammatorisch. Darüber hinaus wird das Enzym Elastase, welches die Umwandlung von Progranulin zu Granulinen katalysiert, physiologischerweise durch neutrophile Granulozyten vermehrt bei Entzündungsreaktionen sezerniert [87]. Dies unterstreicht die proinflammatorische Rolle der Granuline und legt nahe, dass verminderte Progranulinspiegel Ausdruck eines Ungleichgewichts zu Gunsten entzündungsfördernder Prozesse sein könnten. Ferner beinhaltet die GRN-Promoterregion regulatorische Elemente, welche der Beeinflussung durch Zytokine wie IL-6, das ebenfalls in die Pathophysiologie der bipolaren Störung impliziert ist, unterliegen [88].

Dass erniedrigte Progranulinspiegel im Blutplasma kein auf die Peripherie begrenztes Phänomen sind, sondern auch Auswirkungen auf das Zentralnervensystem bestehen, zeigten Liquormessungen von Progranulin bei FTLD-Patienten mit GRN-Mutationen. Mutationsträger wiesen dabei im Liquor durchschnittlich 2,4-fach niedrigere Spiegel als die Kontrollgruppe auf [83]. Diese Patienten wiesen ebenfalls erniedrigte periphere Progranulinkonzentrationen auf. Somit könnte diese Verbindung zu zentralnervösen Prozessen auch bei bipolar erkrankten Patienten bestehen.

Expressionsanalysen konnten GRN-mRNA u.a. in kortikalen und hippocampalen Pyramidenzellen nachweisen [72]. Des Weiteren finden sich auffallend hohe Spiegel während der Embryonalentwicklung in neuroepithelialen Zellen. Diese Befunde deuten auf eine Beteiligung sowohl an höheren geistigen Aufgaben wie der Gedächtnisbildung als auch an neuronalen Entwicklungsprozessen hin. Aber auch im adulten ZNS scheint der Progranulinspiegel für neuronales Wachstum von Bedeutung zu sein. In kultivierten Neuronen begünstigte Progranulin das Zellüberleben und förderte die Aussprossung von Nervenzellfortsätzen [89]. Wie bereits einleitend erwähnt, wurden bei bipolaren Patienten Auffälligkeiten in Proteinen, wie Fas-Ligand, CD40-Ligand oder TNF- $\alpha$ , gefunden, die über apoptotische Prozesse regulierend auf das Zellüberleben wirken [59]. Folglich könnte das Fehlen neurotropher Impulse durch verminderte Progranulinkonzentrationen zur Krankheitsentstehung beitragen. Ein weiterer Beleg für die neurotrophe Wirkung ist die erhöhte Genexpression von Progranulin nach zentralnervösen Traumata. Interessanterweise erfolgt diese vermehrte Bildung von mRNA im Gegensatz zu den meisten anderen Wachstumsfaktoren verzögert, was eher für Effekte auf das langfristige Überleben neuronaler Strukturen als auf eine akute Antwort auf Verletzung spricht [90].

Die GRN-Expression kann zwar in einigen Neuronengruppen des ZNS beobachtet werden, findet aber in deutlich größerem Ausmaß in sogenannten Mikrogliazellen statt. Diese mononukleären Phagozyten bilden den maßgeblichen Teil der Immunantwort im ZNS. Ihnen kommt die wesentliche Aufgabe zu, die nicht regenerationsfähigen Neurone vor pathogenen Einflüssen zu schützen, ohne dabei Kollateralschäden zu erzeugen. Des Weiteren begünstigen sie nach Verletzungen die Regeneration von Neuronen durch inflammatorische Reaktionen [91]. Sie stammen von Vorläufern der hämatopoietischen Zellen des Mesoderms ab, was mit der Tatsache, dass Progranulin auch peripher von mesodermalen Zellen vermehrt gebildet wird, in Einklang steht. Insbesondere bei der Aktivierung von Mikroglia, z.B. durch Infektionen oder Neurodegeneration, wird Progranulin-mRNA vermehrt gebildet [87]. Die Aktivierung geht mit einer Produktion von Zytokinen, Mediatoren und antigenpräsentierenden Oberflächenproteinen einher und stellt einen Vorgang der Neuroinflammation dar. Somit lässt sich erneut eine Beziehung zwischen Progranulin und immunmodulatorischen Vorgängen herstellen.

Betrachtet man die Wirkung von Progranulin bei Entzündungen in peripheren Geweben und die Mechanismen der Mikrogliaaktivierung, ist eine präzise Regulation der Progranulinexpression im ZNS von großer Bedeutung, um die Zellhomöostase aufrecht zu erhalten. Ist dieses sensible Gleichgewicht gestört, kommt es zu pathologischen Prozessen der Neuroinflammation und Neurodegeneration, die zur Entstehung neuropsychiatrischer Syndrome beitragen könnten.

Diese Befunde stützen also sowohl die Theorie einer Beteiligung von Entzündungsprozessen bei der Genese psychiatrischer Erkrankungen und bekräftigen auch die immunmodulatorische und neuroprotektive Rolle des Progranulins.

Dass Progranulin zwar v.a. von Mikroglia exprimiert wird, aber dennoch direkte Auswirkungen auf Neuronen des ZNS hat, konnten Hu et al. [92] kürzlich bestätigen. Sie identifizierten das Protein Sortilin (SORT1) als Bindungsstelle für Progranulin auf kortikalen Neuronen. Progranulin kann dadurch mittels Endozytose in die Zellen aufgenommen werden. Darüber hinaus konnten bei Mäusen, welchen SORT1 fehlt, 2,5 bis 5-fach erhöhte Progranulinkonzentrationen beobachtet werden. SORT1 scheint also Progranulinspiegel *in vivo* kontrollieren zu können und wäre daher als möglicher Faktor der Progranulinregulation für weitere Untersuchungen durchaus von Interesse. Auch beeinflusst Sortilin neurotrophe Prozesse u.a. über die BDNF-Sekretion in Neuronen [93] und könnte somit auch im Zusammenhang mit der bipolaren Störung stehen. Eine kürzlich veröffentlichte Studie [94] konnte jedoch zeigen, dass Progranulin neuronales Wachstum auch Sortilin-unabhängig induzieren kann, was eine Beteiligung weiterer Rezeptoren im Progranulin-Wirkmechanismus nahelegt.

So konnte interessanterweise im Jahr 2011 der TNF-Rezeptor als ein weiterer Rezeptor, der an das Progranulin bindet, identifiziert werden [95] und Bahn et al. fanden ein differentielles Expressionsmuster von TNF- $\alpha$  in bipolaren Patienten (s. Kapitel 1.2.2).

Wie bereits einleitend erwähnt (s. Kapitel 1.3.2) findet sich eine auffällige Übereinstimmung der Sekundär- und Tertiärstruktur des Progranulins und des epidermalen Wachstumsfaktors EGF. Dies lässt eine ähnliche Funktionsweise und somit auch eine gemeinsame Rolle in verschiedenen Erkrankungen wie der bipolaren

Störung vermuten. Tatsächlich konnte in GWAS [96] eine Assoziation von EGFR zur BPD hergestellt werden. Dieser Rezeptor dient als Bindungsstelle für EGF und interagiert somit direkt mit dem Protein. Über den PI3K/Akt- sowie den RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg [97] steuert der Tyrosinkinase-Rezeptor u.a. Zellproliferation und –überleben und reguliert in diesem Zuge auch die neuronale Stammzellproliferation [98, 99] und –migration [100]. Ferner werden EGF-gesteuerte Signalwege durch CMTM8 reguliert. Dieses Protein war in einer großangelegten Studie des WTCCC ebenfalls mit der bipolaren Störung assoziiert [101].

Geht man von einer vergleichbaren Rezeptorwirkung auf gemeinsame Zielproteine aus, unterstreichen diese Befunde nicht nur die Rolle des EGFs in neuronalen Prozessen, sondern auch die des Progranulins.

Zusammenfassend lassen sich bei einem Mangel an Progranulin also v.a. Störungen neurotropher und immunmodulatorischer Regulationsmechanismen des Zentralnervensystems vermuten. Diese Befunde decken sich auch mit der in Kapitel 1.2.2 formulierten Hypothese, dass derartige Pathomechanismen an der Entstehung der bipolaren Störung beteiligt sind.

#### **4.2 Altersabhängigkeit des peripheren Progranulinspiegels**

Eine weitere Auffälligkeit der Messwerte war die hochsignifikante positive Korrelation zwischen Lebensalter und Progranulinkonzentration. Dies wurde ebenfalls von Ghidoni et al. [83] beobachtet ( $p=0,01$ ) und auch weitere Untersuchungen [60] ließen zumindest einen Trend hin zu obigem Ergebnis sowohl bei bipolaren Patienten als auch bei Kontrollen erkennen. Somit könnte der natürliche Alterungsprozess des Menschen eine Modifikation der zirkulierenden Menge im Laufe des Lebens verursachen. Des Weiteren könnten erhöhte Progranulinspiegel Ausdruck einer Antwort auf neurodegenerative oder -inflammatorische Prozesse, die mit steigendem Alter einhergehen, darstellen. Aufgrund dieser Korrelation lässt sich eine Erklärung dafür ableiten, warum die Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollgruppe bzgl. der Progranulinkonzentrationen im Vergleich zur Studie von Galimberti et al. [60] verhältnismäßig gering ausfielen. Während in besagter Studie die Kontrollen

durchschnittlich 18,6 Jahre älter als die Patienten waren, ist das Verhältnis in vorliegender Arbeit genau umgekehrt (Patienten:  $48,1 \pm 12,56$  Jahre, Kontrollen:  $37,7 \pm 13,93$  Jahre) und der Konzentrationsunterschied demzufolge geringer. Der Altersunterschied der beiden Gruppen sollte also keinen negativen Effekt auf die Aussagekraft haben, sondern vielmehr die Signifikanz der Ergebnisse unterstreichen.

### **4.3 Genetische Untersuchungen des Progranulin-Gens**

Sowohl beim Vergleich der Genotypen- als auch der Haplotypenverteilung konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv gefunden werden. Dies lässt einen Einfluss der untersuchten Polymorphismen auf die Krankheitsentstehung eher fraglich erscheinen. Dabei muss aber die mit 102 Patienten und 79 Kontrollen verhältnismäßig geringe Zahl an Probanden bedacht werden, die möglicherweise aufgrund zu geringer Power kein aussagekräftiges Ergebnis zulässt und falsch-negative Ergebnisse produzieren kann. So lag bspw. der Studie von Galimberti et al. [60], bei der sich signifikante Unterschiede ergaben, eine deutlich größere Stichprobe von 574 Kontrollen und 237 bipolaren Patienten zu Grunde. Eine Weiterführung der Untersuchungen anhand größerer Fallzahlen ist somit mit Sicherheit sinnvoll, um Widersprüche dieser Art zu klären.

Im Patientenkollektiv konnte ein Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus rs5848 und dem gemessenen Progranulinspiegel hergestellt werden. Zwar scheint das mutante Allel bei bipolaren Patienten nicht signifikant häufiger aufzutreten als bei Kontrollen, allerdings geht das Auftreten insbesondere bei Patienten, nicht jedoch bei Kontrollen, mit einem erniedrigten Proteinspiegel einher. Dieser Sachverhalt unterstreicht die Rolle einer niedrigen Progranulinkonzentration für die Ausbildung einer bipolaren Störung zusätzlich.

Kein Einfluss auf die gemessenen Progranulinkonzentrationen fand sich hingegen bei den beiden anderen untersuchten SNPs, die im Progranulingen lokalisiert sind.

Sowohl die positiven als auch negativen Ergebnisse müssten hier allerdings noch anhand größerer Fallzahlen überprüft werden. Möglicherweise spielen auch andere

genetische Faktoren sowie nicht genetische Faktoren auf mRNA- oder Proteinebene bzw. epigenetische Phänomene eine modulierende Rolle.

#### 4.3.1 Krankheitswert der untersuchten SNPs

Neben der errechneten Genotypenverteilung spielt natürlich auch die Betrachtung der einzelnen Polymorphismen aus funktioneller Perspektive eine entscheidende Rolle, um ihren Krankheitswert beurteilen zu können. Untersucht man die drei SNPs aus molekulargenetischer Sicht, liegen rs2879096 und rs4792938 in nicht codierenden Bereichen (Introns) des Progranulingens und haben somit zumindest keinen direkten Einfluss auf die Proteinstruktur. Jedoch sprechen Daten dafür, dass letzterer als regulatorischer Polymorphismus Einfluss auf die Transkription und folglich die Proteinkonzentration nehmen könnte [102]. Bzgl. rs2879096 ist bislang keine funktionelle Bedeutung, wie z.B. ein Einfluss auf die Genregulation oder RNA-Prozessierung, bekannt. rs5848 hingegen liegt in der 3'UTR-Region des Gens, welche, wie bereits oben erwähnt, dem Translationssuppressor MIR659 als Bindungsstelle dient. Daher könnten Mutationen durch eine erhöhte Bindungsrate von MIR659 [82] und somit durch Translationshemmung schließlich funktionelle Auswirkungen auf die GRN-Expression zur Folge haben. Dies wird auch durch obige Befunde bestärkt, da Patienten, die Träger des mutanten Allels sind, signifikant niedrigere Progranulinspiegel aufweisen als Patienten mit Wildtyp- oder heterozygotem Allel.

Die Datenlage zu Assoziationen der drei Polymorphismen zu neuropsychiatrischen Erkrankungen ist insbesondere in Bezug auf die bipolare Erkrankung noch relativ dünn. So konnte bzgl. rs2879096 und rs4792938 ein gehäuftes Auftreten der Risikogenvariante bei der primär progressiven Multiplen Sklerose beobachtet werden [103], wohingegen diese bei der bipolaren Störung laut Galimberti et al. [60] einen protektiven Effekt aufweist. rs4792938 ist außerdem mit gehäuften Auftreten der FTL-D-U assoziiert [102]. Dagegen finden sich in der Literatur mehr Daten zu rs5848. Insbesondere konnte eine Assoziation zur FTL-D-U hergestellt werden [82], aber auch bei neuropsychiatrischen Pathologien wie der Hippokampussklerose [104, 105] oder der Alzheimer-Demenz [106] zeigten sich Auffälligkeiten.

Interessanterweise wiesen verschiedene Befunde auch biochemische Auswirkungen bestimmter rs5848-Genotypen nach. So zeigten Fenoglio et al. [107], dass mit dem homozygoten Auftreten des mutanten Allels eine verminderte Produktion von Progranulin-mRNA, sowohl im Liquor als auch in mononukleären Blutzellen dementer Patienten vom Alzheimer-Typ, einhergeht. Dies konnten Hsiung et al. [108] auf Proteinebene bestätigen, indem sie Progranulinspiegel im Serum von Patienten mit Demenzerkrankungen und gesunden Kontrollen bestimmten. In beiden Gruppen wiesen homozygote Träger des mutanten Allels signifikant niedrigere Konzentrationen auf. Die vorliegenden Befunde konnten diesen Einfluss bei bipolaren Patienten belegen, da hier ebenfalls erniedrigte Progranulinspiegel mit dem mutanten Allel einhergingen. Dies betont die Relevanz des Progranulins bei diversen neuropsychiatrischen Erkrankungen.

#### 4.3.2 Assoziation von GRN-Mutationen zur bipolaren Störung

Auch wenn bzgl. der drei untersuchten SNPs in vorliegender Arbeit keine Assoziation gefunden wurde, konnten zumindest in genomweiten Kopplungsanalysen signifikante Werte bzgl. einer Kopplung des langen Armes von Chromosom 17 mit der bipolaren Erkrankung hergestellt werden [109]. Für die Region 17q21, in der GRN lokalisiert ist, wurde eine Assoziation zur bipolaren Störung nachgewiesen [110], wobei dies relativ unspezifisch auch bei anderen neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen, wie der FTLD oder der Schizophrenie, der Fall war.

Diese Tatsache könnte natürlich auch in gemeinsamen Pathomechanismen begründet liegen. Es scheint darüber hinaus auch eine biochemische Interaktion zwischen dem für die ubiquitin-positive FTLD verantwortlichen TDP-43 und dem Progranulin zu bestehen. Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass Progranulin die intrazelluläre Verarbeitung des TDP-43 beeinflusst, wobei eine Störung des Progranulinstoffwechsels eine TDP-43-Translokation und Akkumulation im Zytoplasma zur Folge haben könnte [87]. Die gemeinsame Rolle des TDP-43-Stoffwechsels wird auch durch Post-Mortem-Untersuchungen von Velakoulis et al. [111] gestützt, die zeigten, dass bei FTLD-Patienten mit schizophreniformen oder bipolaren Initialsymptomen alle von diesen Symptomen betroffenen Studienteilnehmer typische ubiquitin-positive bzw. TDP-43-Ablagerungen aufwiesen.

Im Übrigen konnte auch ein Zusammenhang zwischen dem untersuchten SNP rs5848 und dem Auftreten von TDP-43-Pathologien hergestellt werden [104, 112]. Für eine gemeinsame Rolle des GRN-Locus bzw. einen gemeinsamen Pathomechanismus bei der frontotemporalen Demenz und psychiatrischen Erkrankungen sprechen auch die für die FTD typischen Symptome aus dem psychiatrischen Formenkreis, wie Verhaltensauffälligkeiten oder Persönlichkeitsveränderungen. Ferner treten gehäuft komorbide psychiatrische Erkrankungen, wie affektive Störungen oder Schizophrenie, auf. Dies untermauert auch die kürzlich publizierte Fallstudie zweier FTLD-Patienten mit GRN-Mutationen, die eine bipolare Störung in ihrer Vorgeschichte aufwiesen [113]. Es lassen sich also auch abgesehen von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit durchaus Verbindungen zwischen Progranulin und der bipolaren Störung herstellen, wobei eine strikte Abgrenzung von anderen Erkrankungen nicht möglich ist, da unter Umständen pathomechanistische Parallelen oder Interaktionen bestehen können. Auf Grund der gefundenen Auffälligkeiten wäre es daher durchaus von Interesse, weitere SNPs im Progranulin-Gen zu untersuchen oder das Gen bei einzelnen Versuchspersonen gar zu sequenzieren, um weitere Verbindungen zwischen der bipolaren Störung und dem Progranulin-Gen zu knüpfen.

#### **4.4 Grenzen und Fehlerquellen der Arbeit**

Da unvermeidlich bei der praktischen Durchführung einer wissenschaftlichen Arbeit limitierende Faktoren auftreten, soll auch auf mögliche Fehlerquellen, die die Aussagekraft der Ergebnisse einschränken könnten, hingewiesen werden. Selbstverständlich sind gewisse Ungenauigkeiten auf Grund labortechnischer Abläufe, wie dem Auftauen oder Pipettieren der Proben, nicht vollständig zu vermeiden. Das verwendete Progranulin-ELISA-Kit erkennt außerdem nur die vollständige Progranulinsequenz und keine Spaltprodukte oder verkürzte Proteine [84]. Dies könnte, neben dem in Kapitel 1.3.4 erwähnten fehlgesteuerten Progranulinmetabolismus, einen weiteren Grund für den mehr als um die Hälfte erniedrigten Progranulinspiegel bei Loss-of-Function-Mutationsträgern darstellen, der nicht allein durch Haploinsuffizienz erklärbar ist.

Ferner sollte eine möglichst große Stichprobe angestrebt werden, um ein hohes Signifikanzniveau zu erreichen und somit das Risiko einer Fehleinschätzung durch falsch-positive Befunde zu minimieren.

Wie bereits erwähnt scheinen viele der identifizierten Suszeptibilitätsgene und Pathomechanismen unspezifisch bei verschiedenen Formen psychiatrischer Erkrankungen vorzuliegen. So könnten auch erniedrigte Progranulinspiegel eher zu pathologischen Veränderungen und bestimmten phänotypischen Merkmalen führen, die mehreren Erkrankungen gemeinsam sind. Jedoch stellt dies sicherlich eine besondere Herausforderung an die Wissenschaft dar, durch eine offene Herangehensweise einen umfassenden Erklärungsansatz zu finden. Insbesondere die Einbeziehung schizophrener Patienten in die Untersuchungen könnte dabei von Interesse sein.

Der veränderte Progranulinspiegel könnte auch lediglich ein Epiphänomen eines zugrunde liegenden pathologischen Prozesses sein und selbst keine kausale Wirkung haben. So könnte ein bei bipolaren Patienten gestörter Stoffwechselweg als Nebeneffekt zu verminderten Progranulinspiegeln führen, die jedoch keinerlei pathophysiologischen Wert aufweisen und maximal diagnostischen, nicht jedoch therapeutischen Nutzen aufweisen.

Auch könnte die bipolare Störung möglicherweise mit bestimmten Lebensumständen der Patienten einhergehen. Dies hätte zur Folge, dass ein krankheitsspezifisches Spektrum an Umweltfaktoren den Progranulinspiegel beeinflusst. Bspw. könnte dies in Form von andersartigen Ernährungsgewohnheiten oder der erhöhten Exposition von Noxen, wie Alkohol und Nikotin, geschehen. Ebenso könnten im Zuge der Erkrankung auftretende veränderte Schlafgewohnheiten, mangelnde körperliche Aktivität oder sozialer Stress Einfluss auf den Progranulinspiegel nehmen. Schließlich muss auch angemerkt werden, dass ein Großteil der Patienten zum Zeitpunkt der Rekrutierung unter psychopharmakologischer Behandlung stand. Demnach kann eine medikamentöse Alteration der Progranulinkonzentrationen nicht ausgeschlossen werden.

## 5 Zusammenfassung

Durch Messung der Progranulinspiegel im Blutplasma mittels ELISA konnte in vorliegender Arbeit ein signifikanter Unterschied zwischen bipolaren Patienten und Kontrollen nachgewiesen werden. Dabei wies das Patientenkollektiv durchschnittlich niedrigere Konzentrationen auf. Befunde vorausgegangener Studien deuten darauf hin, dass ein peripherer Progranulinmangel auch mit zentralnervösen Veränderungen einhergehen kann und somit einen Anteil an der Pathophysiologie der bipolaren Störung haben könnte. Insbesondere eine immunologisch-entzündliche Dysregulation sowie fehlende neurotrophe Impulse könnten dabei eine wesentliche Rolle spielen.

Überdies fiel bei der Auswertung der Daten eine hochsignifikante Korrelation zwischen Progranulinspiegel und Lebensalter der Probanden auf. Dabei nahm mit steigendem Alter auch die periphere Progranulinkonzentration zu, was im Zuge des physiologischen Alterungsprozesses oder aber auch als Folge von neurodegenerativen bzw. -inflammatorischen Vorgängen auftreten könnte.

Bei der molekulargenetischen Untersuchung der Polymorphismen rs2879096, rs4792938 und rs5848 konnten keine signifikanten Unterschiede in der Genotypen- und Haplotypenverteilung zwischen Patienten und Kontrollen gefunden werden, was sich möglicherweise auf die relativ kleine Stichprobe von 181 Probanden zurückführen lässt. Zumindest existieren Hinweise auf eine Rolle der jeweiligen Polymorphismen bei verschiedenen neuropsychiatrischen Erkrankungen, möglicherweise auch bei der bipolaren Störung.

Außerdem fand sich bei den im Progranulingen liegenden SNPs rs2879096 und rs4792938 keine Assoziation einer Risikogenvariante zu veränderten Progranulinspiegeln, das heißt keiner der beiden Polymorphismen scheint funktionelle Bedeutung zu haben. Somit ließe sich kein Effekt des Genotyps auf die periphere Progranulinkonzentration nachweisen, wobei wiederum die verhältnismäßig niedrigen Fallzahlen beachtet werden müssen.

Der in der 3'UTR liegende SNP rs5848 scheint hingegen im Patientenkollektiv zu deutlich erniedrigten Proteinspiegeln zu führen. Dieser Befund steht auch im Einklang

mit einer Vielzahl von Studien, die rs5848 eine Bedeutung bei verschiedenen neuropsychiatrischen Erkrankungen beimessen und unterstreicht die Rolle niedriger Progranulinkonzentrationen in der bipolaren Störung.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei bipolaren Patienten signifikant niedrigere Progranulinkonzentrationen als in der Kontrollgruppe gemessen wurden. Weitere Studien, welche die zu Grunde liegenden biochemischen Vorgänge und Pathomechanismen erforschen, wären nun von Interesse, um ein besseres Verständnis der Erkrankung zu erlangen. Langfristig wäre die Nutzung des Progranulinspiegels als diagnostisches Werkzeug erstrebenswert, wobei sich dies auf Grund des großen Overlaps zwischen Patienten- und Kontrollgruppe wohl eher schwierig gestalten wird. Die relativ unkomplizierte Progranulinbestimmung im Blutplasma könnte möglicherweise im Rahmen einer Messung vieler verschiedener Parameter als Baustein eines diagnostischen Apparates zur Erkennung der bipolaren affektiven Störung dienen. Somit wären weiterführende Untersuchungen anhand größerer Fallzahlen und funktionelle Studien der pathomechanistischen Zusammenhänge des Progranulins ein interessantes Feld, um einige der zahlreichen ungeklärten Fragen rund um die bipolare Störung weiter aufzuklären.

## 6 Literatur

1. Woolf, V., *Ein eigenes Zimmer*. Reclams Universal-Bibliothek 1287 : Belletristik. 1989, Leipzig: Reclam. 345 S.
2. Jamison, K.R., *Great wits and madness: more near allied?* Br J Psychiatry, 2011. **199**(5): p. 351-2.
3. American Psychiatric Association and American Psychiatric Association Task Force on DSM-IV, *Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-IV-TR*. 4. ed. 2000, Washington, DC: American Psychiatric Association. XXXV, 943 S.
4. Akiskal, H.S., et al., *Re-evaluating the prevalence of and diagnostic composition within the broad clinical spectrum of bipolar disorders*. J Affect Disord, 2000. **59 Suppl 1**: p. S5-S30.
5. Akiskal, H.S., et al., [*Temperament and affective disorders. The TEMPS-A Scale as a convergence of European and US-American concepts*]. Nervenarzt, 2002. **73**(3): p. 262-71.
6. Angst, J., et al., *Diagnostic issues in bipolar disorder*. Eur Neuropsychopharmacol, 2003. **13 Suppl 2**: p. S43-50.
7. Ketter, T.A., *Diagnostic features, prevalence, and impact of bipolar disorder*. J Clin Psychiatry, 2010. **71**(6): p. e14.
8. Wittchen, H.U., et al., *The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010*. Eur Neuropsychopharmacol, 2011. **21**(9): p. 655-79.
9. Baldessarini, R.J., et al., *Onset-age of bipolar disorders at six international sites*. J Affect Disord, 2010. **121**(1-2): p. 143-6.
10. Baldessarini, R.J., et al., *Age at onset versus family history and clinical outcomes in 1,665 international bipolar-I disorder patients*. World Psychiatry, 2012. **11**(1): p. 40-6.
11. Bellivier, F., et al., *Age at onset in bipolar I affective disorder in the USA and Europe*. World J Biol Psychiatry, 2011.
12. Smoller, J.W. and C.T. Finn, *Family, twin, and adoption studies of bipolar disorder*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2003. **123C**(1): p. 48-58.
13. Lichtenstein, P., et al., *Common genetic determinants of schizophrenia and bipolar disorder in Swedish families: a population-based study*. Lancet, 2009. **373**(9659): p. 234-9.
14. Shih, R.A., P.L. Belmonte, and P.P. Zandi, *A review of the evidence from family, twin and adoption studies for a genetic contribution to adult psychiatric disorders*. Int Rev Psychiatry, 2004. **16**(4): p. 260-83.
15. Manolio, T.A., L.D. Brooks, and F.S. Collins, *A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease*. J Clin Invest, 2008. **118**(5): p. 1590-605.
16. Pritchard, J.K. and N.J. Cox, *The allelic architecture of human disease genes: common disease-common variant...or not?* Hum Mol Genet, 2002. **11**(20): p. 2417-23.
17. McQueen, M.B., et al., *Combined analysis from eleven linkage studies of bipolar disorder provides strong evidence of susceptibility loci on chromosomes 6q and 8q*. Am J Hum Genet, 2005. **77**(4): p. 582-95.

18. Barden, N., et al., *Analysis of single nucleotide polymorphisms in genes in the chromosome 12Q24.31 region points to P2RX7 as a susceptibility gene to bipolar affective disorder*. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2006. **141B**(4): p. 374-82.
19. Fan, J. and P. Sklar, *Genetics of bipolar disorder: focus on BDNF Val66Met polymorphism*. *Novartis Found Symp*, 2008. **289**: p. 60-72; discussion 72-3, 87-93.
20. Anguelova, M., C. Benkelfat, and G. Turecki, *A systematic review of association studies investigating genes coding for serotonin receptors and the serotonin transporter: II. Suicidal behavior*. *Mol Psychiatry*, 2003. **8**(7): p. 646-53.
21. Zhang, Z., et al., *The Val/Met functional polymorphism in COMT confers susceptibility to bipolar disorder: evidence from an association study and a meta-analysis*. *J Neural Transm*, 2009. **116**(10): p. 1193-200.
22. Green, E.K., et al., *Replication of bipolar disorder susceptibility alleles and identification of two novel genome-wide significant associations in a new bipolar disorder case-control sample*. *Mol Psychiatry*, 2012.
23. Psychiatric, G.C.B.D.W.G., *Large-scale genome-wide association analysis of bipolar disorder identifies a new susceptibility locus near ODZ4*. *Nat Genet*, 2011. **43**(10): p. 977-83.
24. Cichon, S., et al., *Genome-wide association study identifies genetic variation in neurocan as a susceptibility factor for bipolar disorder*. *Am J Hum Genet*, 2011. **88**(3): p. 372-81.
25. Baum, A.E., et al., *A genome-wide association study implicates diacylglycerol kinase eta (DGKH) and several other genes in the etiology of bipolar disorder*. *Mol Psychiatry*, 2008. **13**(2): p. 197-207.
26. Ferreira, M.A., et al., *Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder*. *Nat Genet*, 2008. **40**(9): p. 1056-8.
27. Domschke, K. and A. Reif, *Behavioral Genetics of Affective and Anxiety Disorders*. *Curr Top Behav Neurosci*, 2012.
28. Schulze, T.G., *Genetic research into bipolar disorder: the need for a research framework that integrates sophisticated molecular biology and clinically informed phenotype characterization*. *Psychiatr Clin North Am*, 2010. **33**(1): p. 67-82.
29. Weber, H., et al., *Cross-disorder analysis of bipolar risk genes: further evidence of DGKH as a risk gene for bipolar disorder, but also unipolar depression and adult ADHD*. *Neuropsychopharmacology*, 2011. **36**(10): p. 2076-85.
30. Athanasiu, L., et al., *Gene variants associated with schizophrenia in a Norwegian genome-wide study are replicated in a large European cohort*. *J Psychiatr Res*, 2010. **44**(12): p. 748-53.
31. Nyegaard, M., et al., *CACNA1C (rs1006737) is associated with schizophrenia*. *Mol Psychiatry*, 2010. **15**(2): p. 119-21.
32. Green, E.K., et al., *The bipolar disorder risk allele at CACNA1C also confers risk of recurrent major depression and of schizophrenia*. *Mol Psychiatry*, 2010. **15**(10): p. 1016-22.
33. Zhang, D., et al., *Singleton deletions throughout the genome increase risk of bipolar disorder*. *Mol Psychiatry*, 2009. **14**(4): p. 376-80.

34. Grozeva, D., et al., *Rare copy number variants: a point of rarity in genetic risk for bipolar disorder and schizophrenia*. Arch Gen Psychiatry, 2010. **67**(4): p. 318-27.
35. Leverich, G.S., et al., *Factors associated with suicide attempts in 648 patients with bipolar disorder in the Stanley Foundation Bipolar Network*. J Clin Psychiatry, 2003. **64**(5): p. 506-15.
36. Tsankova, N., et al., *Epigenetic regulation in psychiatric disorders*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(5): p. 355-67.
37. Judd, L.L., et al., *A prospective investigation of the natural history of the long-term weekly symptomatic status of bipolar II disorder*. Arch Gen Psychiatry, 2003. **60**(3): p. 261-9.
38. Judd, L.L., et al., *The long-term natural history of the weekly symptomatic status of bipolar I disorder*. Arch Gen Psychiatry, 2002. **59**(6): p. 530-7.
39. Angst, J., et al., *Prevalence and characteristics of undiagnosed bipolar disorders in patients with a major depressive episode: the BRIDGE study*. Arch Gen Psychiatry, 2011. **68**(8): p. 791-8.
40. Hegerl, U., et al., *Geschwindigkeit des Depressionsbeginns. Ein Merkmal zur Differenzierung uni- und bipolarer affektiver Störungen*. Nervenheilkunde, 2009. **28**: p. 202-204.
41. Montano, C.B. and R. Weisler, *Distinguishing symptoms of ADHD from other psychiatric disorders in the adult primary care setting*. Postgrad Med, 2011. **123**(3): p. 88-98.
42. Wingo, A.P. and S.N. Ghaemi, *A systematic review of rates and diagnostic validity of comorbid adult attention-deficit/hyperactivity disorder and bipolar disorder*. J Clin Psychiatry, 2007. **68**(11): p. 1776-84.
43. Savitz, J.B., M. Solms, and R.S. Ramesar, *Neurocognitive function as an endophenotype for genetic studies of bipolar affective disorder*. Neuromolecular Med, 2005. **7**(4): p. 275-86.
44. Yatham, L.N., et al., *The International Society for Bipolar Disorders-Battery for Assessment of Neurocognition (ISBD-BANC)*. Bipolar Disord, 2010. **12**(4): p. 351-63.
45. Savitz, J. and W.C. Drevets, *Bipolar and major depressive disorder: neuroimaging the developmental-degenerative divide*. Neurosci Biobehav Rev, 2009. **33**(5): p. 699-771.
46. Soares, J.C., et al., *Platelet membrane phospholipids in euthymic bipolar disorder patients: are they affected by lithium treatment?* Biol Psychiatry, 1999. **45**(4): p. 453-7.
47. Emamghoreishi, M., et al., *High intracellular calcium concentrations in transformed lymphoblasts from subjects with bipolar I disorder*. Am J Psychiatry, 1997. **154**(7): p. 976-82.
48. Walden, J. and H. Grunze, *Bipolare affektive Störungen : Diagnostik und Behandlung ; 5 Tabellen*. 5., überarb. und erw. Aufl. ed. 2009, Stuttgart [u.a.]: Thieme. X, 55 S.
49. Muller, N. and M.J. Schwarz, *Neuroimmune-endocrine crosstalk in schizophrenia and mood disorders*. Expert Rev Neurother, 2006. **6**(7): p. 1017-38.

50. Maes, M., et al., *Interleukin-2 and interleukin-6 in schizophrenia and mania: effects of neuroleptics and mood stabilizers*. J Psychiatr Res, 1995. **29**(2): p. 141-52.
51. Kunz, M., et al., *Serum levels of IL-6, IL-10 and TNF-alpha in patients with bipolar disorder and schizophrenia: differences in pro- and anti-inflammatory balance*. Rev Bras Psiquiatr, 2011. **33**(3): p. 268-74.
52. Muller, N., et al., *The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib has therapeutic effects in major depression: results of a double-blind, randomized, placebo controlled, add-on pilot study to reboxetine*. Mol Psychiatry, 2006. **11**(7): p. 680-4.
53. Akhondzadeh, S., et al., *Clinical trial of adjunctive celecoxib treatment in patients with major depression: a double blind and placebo controlled trial*. Depress Anxiety, 2009. **26**(7): p. 607-11.
54. Rupprecht, R., et al., *In vivo and in vitro effects of glucocorticoids on lymphocyte proliferation in depression*. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 1991. **241**(1): p. 35-40.
55. Starkman, M.N. and D.E. Scheingart, *Neuropsychiatric manifestations of patients with Cushing's syndrome. Relationship to cortisol and adrenocorticotrophic hormone levels*. Arch Intern Med, 1981. **141**(2): p. 215-9.
56. Moore, G.J., et al., *Lithium-induced increase in human brain grey matter*. Lancet, 2000. **356**(9237): p. 1241-2.
57. Gould, T.D., et al., *Emerging experimental therapeutics for bipolar disorder: insights from the molecular and cellular actions of current mood stabilizers*. Mol Psychiatry, 2004. **9**(8): p. 734-55.
58. Teixeira, A.L., et al., *Circulating levels of brain-derived neurotrophic factor: correlation with mood, cognition and motor function*. Biomark Med, 2010. **4**(6): p. 871-87.
59. Herberth, M., et al., *Peripheral profiling analysis for bipolar disorder reveals markers associated with reduced cell survival*. Proteomics, 2011. **11**(1): p. 94-105.
60. Galimberti, D., et al., *Progranulin gene variability and plasma levels in bipolar disorder and schizophrenia*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e32164.
61. Bhandari, V. and A. Bateman, *Structure and chromosomal location of the human granulin gene*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **188**(1): p. 57-63.
62. Bateman, A. and H.P. Bennett, *Granulins: the structure and function of an emerging family of growth factors*. J Endocrinol, 1998. **158**(2): p. 145-51.
63. Tolkatchev, D., et al., *Structure dissection of human progranulin identifies well-folded granulin/epithelin modules with unique functional activities*. Protein Sci, 2008. **17**(4): p. 711-24.
64. Hrabal, R., et al., *The hairpin stack fold, a novel protein architecture for a new family of protein growth factors*. Nat Struct Biol, 1996. **3**(9): p. 747-52.
65. Couto, M.A., et al., *Identification of eNAP-1, an antimicrobial peptide from equine neutrophils*. Infect Immun, 1992. **60**(8): p. 3065-71.
66. Nakakura, N., et al., *Isolation and structural determination of three peptides from the insect Locusta migratoria. Identification of a deoxyhexose-linked peptide*. Eur J Biochem, 1992. **204**(1): p. 147-53.

67. Uesaka, T., et al., *Somatostatin-, vasoactive intestinal peptide-, and granulin-like peptides isolated from intestinal extracts of goldfish, Carassius auratus*. Gen Comp Endocrinol, 1995. **99**(3): p. 298-306.
68. Berks, M., *The C. elegans genome sequencing project. C. elegans Genome Mapping and Sequencing Consortium*. Genome Res, 1995. **5**(2): p. 99-104.
69. Watanabe, H., et al., *Molecular cloning and gibberellin-induced expression of multiple cysteine proteinases of rice seeds (oryzains)*. J Biol Chem, 1991. **266**(25): p. 16897-902.
70. Bateman, A., et al., *Granulins, a novel class of peptide from leukocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **173**(3): p. 1161-8.
71. Shoyab, M., et al., *Epithelins 1 and 2: isolation and characterization of two cysteine-rich growth-modulating proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(20): p. 7912-6.
72. Daniel, R., et al., *Cellular localization of gene expression for progranulin*. J Histochem Cytochem, 2000. **48**(7): p. 999-1009.
73. He, Z. and A. Bateman, *Progranulin gene expression regulates epithelial cell growth and promotes tumor growth in vivo*. Cancer Res, 1999. **59**(13): p. 3222-9.
74. Tangkeangsirisin, W. and G. Serrero, *PC cell-derived growth factor (PCDGF/GP88, progranulin) stimulates migration, invasiveness and VEGF expression in breast cancer cells*. Carcinogenesis, 2004. **25**(9): p. 1587-92.
75. Liao, L.M., et al., *Identification of a human glioma-associated growth factor gene, granulin, using differential immuno-absorption*. Cancer Res, 2000. **60**(5): p. 1353-60.
76. Matsumura, N., et al., *Oncogenic property of acrogranin in human uterine leiomyosarcoma: direct evidence of genetic contribution in in vivo tumorigenesis*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(5): p. 1402-11.
77. He, Z., et al., *Progranulin (PC-cell-derived growth factor/acrogranin) regulates invasion and cell survival*. Cancer Res, 2002. **62**(19): p. 5590-6.
78. He, Z., et al., *Progranulin is a mediator of the wound response*. Nat Med, 2003. **9**(2): p. 225-9.
79. Baker, M., et al., *Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17*. Nature, 2006. **442**(7105): p. 916-9.
80. Cruts, M., et al., *Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21*. Nature, 2006. **442**(7105): p. 920-4.
81. Yu, C.E., et al., *The spectrum of mutations in progranulin: a collaborative study screening 545 cases of neurodegeneration*. Arch Neurol, 2010. **67**(2): p. 161-70.
82. Rademakers, R., et al., *Common variation in the miR-659 binding-site of GRN is a major risk factor for TDP43-positive frontotemporal dementia*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(23): p. 3631-42.
83. Ghidoni, R., et al., *Low plasma progranulin levels predict progranulin mutations in frontotemporal lobar degeneration*. Neurology, 2008. **71**(16): p. 1235-9.
84. Finch, N., et al., *Plasma progranulin levels predict progranulin mutation status in frontotemporal dementia patients and asymptomatic family members*. Brain, 2009. **132**(Pt 3): p. 583-91.

85. Voet, D., J.G. Voet, and C.W. Pratt, *Fundamentals of biochemistry : life at the molecular level*. 3. ed ed. 2008, Hoboken, NJ
86. Zhu, J., et al., *Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair*. *Cell*, 2002. **111**(6): p. 867-78.
87. Ahmed, Z., et al., *Progranulin in frontotemporal lobar degeneration and neuroinflammation*. *J Neuroinflammation*, 2007. **4**: p. 7.
88. Bhandari, V., et al., *Structural and functional analysis of a promoter of the human granulin/epithelin gene*. *Biochem J*, 1996. **319** ( Pt 2): p. 441-7.
89. Van Damme, P., et al., *Progranulin functions as a neurotrophic factor to regulate neurite outgrowth and enhance neuronal survival*. *J Cell Biol*, 2008. **181**(1): p. 37-41.
90. Matzilevich, D.A., et al., *High-density microarray analysis of hippocampal gene expression following experimental brain injury*. *J Neurosci Res*, 2002. **67**(5): p. 646-63.
91. Ransohoff, R.M. and A.E. Cardona, *The myeloid cells of the central nervous system parenchyma*. *Nature*, 2010. **468**(7321): p. 253-62.
92. Hu, F., et al., *Sortilin-mediated endocytosis determines levels of the frontotemporal dementia protein, progranulin*. *Neuron*, 2010. **68**(4): p. 654-67.
93. Chen, Z.Y., et al., *Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway*. *J Neurosci*, 2005. **25**(26): p. 6156-66.
94. Gass, J., et al., *Progranulin regulates neuronal outgrowth independent of sortilin*. *Mol Neurodegener*, 2012. **7**: p. 33.
95. Tang, W., et al., *The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice*. *Science*, 2011. **332**(6028): p. 478-84.
96. Sklar, P., et al., *Whole-genome association study of bipolar disorder*. *Mol Psychiatry*, 2008. **13**(6): p. 558-69.
97. Wong, R.W. and L. Guillaud, *The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004. **15**(2-3): p. 147-56.
98. Cesetti, T., et al., *Analysis of stem cell lineage progression in the neonatal subventricular zone identifies EGFR+/NG2- cells as transit-amplifying precursors*. *Stem Cells*, 2009. **27**(6): p. 1443-54.
99. Grimm, I., et al., *Coordinate pathways for nucleotide and EGF signaling in cultured adult neural progenitor cells*. *J Cell Sci*, 2009. **122**(Pt 14): p. 2524-33.
100. Kim, Y., et al., *Adult mouse subventricular zone stem and progenitor cells are sessile and epidermal growth factor receptor negatively regulates neuroblast migration*. *PLoS One*, 2009. **4**(12): p. e8122.
101. Wellcome Trust Case Control, C., *Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls*. *Nature*, 2007. **447**(7145): p. 661-78.
102. Galimberti, D., et al., *GRN variability contributes to sporadic frontotemporal lobar degeneration*. *J Alzheimers Dis*, 2010. **19**(1): p. 171-7.
103. Fenoglio, C., et al., *Progranulin gene variability increases the risk for primary progressive multiple sclerosis in males*. *Genes Immun*, 2010. **11**(6): p. 497-503.

104. Dickson, D.W., M. Baker, and R. Rademakers, *Common variant in GRN is a genetic risk factor for hippocampal sclerosis in the elderly*. *Neurodegener Dis*, 2010. **7**(1-3): p. 170-4.
105. Pao, W.C., et al., *Hippocampal sclerosis in the elderly: genetic and pathologic findings, some mimicking Alzheimer disease clinically*. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 2011. **25**(4): p. 364-8.
106. Lee, M.J., et al., *rs5848 variant of progranulin gene is a risk of Alzheimer's disease in the Taiwanese population*. *Neurodegener Dis*, 2011. **8**(4): p. 216-20.
107. Fenoglio, C., et al., *Rs5848 variant influences GRN mRNA levels in brain and peripheral mononuclear cells in patients with Alzheimer's disease*. *J Alzheimers Dis*, 2009. **18**(3): p. 603-12.
108. Hsiung, G.Y., et al., *rs5848 polymorphism and serum progranulin level*. *J Neurol Sci*, 2011. **300**(1-2): p. 28-32.
109. Dick, D.M., et al., *Genomewide linkage analyses of bipolar disorder: a new sample of 250 pedigrees from the National Institute of Mental Health Genetics Initiative*. *Am J Hum Genet*, 2003. **73**(1): p. 107-14.
110. Escamilla, M., et al., *A schizophrenia gene locus on chromosome 17q21 in a new set of families of Mexican and central american ancestry: evidence from the NIMH Genetics of schizophrenia in latino populations study*. *Am J Psychiatry*, 2009. **166**(4): p. 442-9.
111. Velakoulis, D., et al., *Frontotemporal dementia presenting as schizophrenia-like psychosis in young people: clinicopathological series and review of cases*. *Br J Psychiatry*, 2009. **194**(4): p. 298-305.
112. Tartaglia, M.C., et al., *Sporadic corticobasal syndrome due to FTL D-TDP*. *Acta Neuropathol*, 2010. **119**(3): p. 365-74.
113. Cerami, C., et al., *From genotype to phenotype: two cases of genetic frontotemporal lobar degeneration with premorbid bipolar disorder*. *J Alzheimers Dis*, 2011. **27**(4): p. 791-7.

## 7 Abbildungsnachweis

- Abb.1.1 Baldessarini, R.J., et al., *Onset-age of bipolar disorders at six international sites*. J Affect Disord, 2010. **121**(1-2): p. 143-6.
- Abb.1.2 Bateman, A. and H.P. Bennett, *Granulins: the structure and function of an emerging family of growth factors*. J Endocrinol, 1998. **158**(2): p. 145-51.
- Abb.1.3 Galimberti, D., et al., *Progranulin gene variability and plasma levels in bipolar disorder and schizophrenia*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e32164.
- Abb.2.1 [http://www.epitomics.com/images/products/sandwich\\_dual.jpg](http://www.epitomics.com/images/products/sandwich_dual.jpg)

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie Würzburg (Direktor Prof. Dr. med. J. Deckert) durchgeführt.

Besonders sei hier meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med A. Reif und meiner Betreuerin Frau Dr. med. S. Kittel-Schneider für die Überlassung des Themas bzw. die Betreuung der Arbeit gedankt. Durch ihr Fachwissen, ihr großes Engagement und ihre Hilfsbereitschaft förderten sie meine Begeisterung an den klinischen sowie den neurobiologischen Aspekten der Psychiatrie. In ihnen fand ich nicht nur fachlich, sondern auch menschlich eine Betreuung, die ich sehr schätzte.

Juliane Kopf stand mir bei der statistischen Auswertung der Daten immer geduldig und hilfsbereit zur Seite, wofür ich sehr dankbar bin und wodurch auch mein Interesse an statistischen Fragestellungen geweckt wurde.

Des Weiteren möchte ich mich bei Theresia Töpner und Dr. Jasmin Bartl bedanken, die mich in labortechnische Verfahren einarbeiteten und meine Arbeit durch ihren fachkundigen Rat stets unterstützten.

Daniel Bury möchte ich für die gute Zusammenarbeit bei der Rekrutierung von bipolaren Patienten danken. Dr. Heike Weber ermöglichte mir einen Einblick in die Haplotypenanalyse genetischer Daten.

Abschließend danke ich meiner Familie und Lisa Stelzner für all die Motivation und Unterstützung, die sie im Laufe der Arbeit aufbrachten.

## **Lebenslauf von Johannes Weigl**

### **Hochschulausbildung**

Oktober und November 2013	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,5)
August 2012 bis Juli 2013	Ausübung des Praktischen Jahres an der Universität Nagasaki, Japan, der Universität Galway, Irland und der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Oktober 2009 bis November 2013	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (klinischer Abschnitt)
August und September 2009	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)
Oktober 2007 bis September 2009	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg (vorklinischer Abschnitt)

### **Promotion**

Juni 2011 bis November 2013	Thema der Doktorarbeit: „Die Rolle von Progranulin in der bipolar-affektiven Störung“, Doktorvater Prof. Dr. Andreas Reif, Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie, Universität Würzburg
-----------------------------	--

### **Schulische Ausbildung**

2007	Allgemeine Hochschulreife (Note 1,4)
1998 bis 2007	Hans-Leinberger-Gymnasium, Landshut
1994 bis 1998	Grundschule Kumhausen

Würzburg, 14.11.2013

---

Johannes Weigl