

**Diplomarbeit**

**Circadiane Rhythmen und ER-Stress**

**Genexpression von *ARNTL*, *MAO-A*, *BiP* und *CHOP* in  
affektiven Phasen der bipolaren Erkrankung**

eingereicht von

**Helena Hohenberger**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor(in) der gesamten Heilkunde  
(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

**Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapeutische  
Medizin**

unter der Anleitung von

**Priv.-Doz. Dr. med.sci. Dr. med.univ. Susanne Bengesser  
Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. med.univ. et scient.med. Eva Reininghaus**

Graz, am 20.04.2018

*Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, am 20.04.2018*

*Helena Hohenberger eh*



## Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Fertigstellung dieser Diplomarbeit fachlich und persönlich unterstützt haben.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinen beiden Betreuerinnen, Priv.-Doz. Dr. Susanne Bengesser und Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. Eva Reininghaus, die diese Arbeit vom Beginn bis zur Fertigstellung begleitet haben. Vielen Dank für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, das geduldige Korrigieren dieser Diplomarbeit und die zahlreichen konstruktiven Rückmeldungen! Vielen Dank!

Meinen beiden Betreuern im Labor, Nathalie Meier-Allard und Dr. Robert Fuchs, gilt auch ein besonderer Dank. Vielen Dank für die ausführlichen, interessanten und hilfreichen Erklärungen im Labor und für das Vertrauen in mich die Experimente auch selbständig durchführen zu dürfen!

Herzlichen Dank an meine Familie, die mir dieses Studium ermöglicht und mich immer unterstützt hat. Insbesondere möchte ich meinem Vater danken, der in den vergangenen Jahren die meisten meiner Arbeiten – auch diese – korrekturgelesen hat.

Vielen lieben Dank auch an meine Freunde, unter denen ebenfalls einige fleißige Korrekturleser waren und vielen Dank für die schönen, gemeinsamen Studienjahre!

## Zusammenfassung

*Einleitung:* Die vorliegende Diplomarbeit beschäftigt sich mit zwei Themen: der molekularen Uhr und dem Endoplasmatischen Retikulum-Stress (ER-Stress) in Bezug auf die bipolare affektive Erkrankung (BD, engl. „bipolar disorder“).

Bipolare Patienten leiden häufig unter einem gestörten circadianen Rhythmus. Die circadiane Zeitgebung erfolgt durch eine rhythmische Expression von Uhrengenen. Die vorliegende Diplomarbeit untersucht *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (ARNTL)*, eines der essentiellen Uhrengene und die *Monoaminoxidase A (MAO-A)*. *MAO-A* stellt die Verbindung der molekularen Uhr und der Stimmungsregulation dar, da *ARNTL* die Transkription von *MAO-A* aktiviert. Das Enzym *Monoaminoxidase A* baut die Neurotransmitter Serotonin, Noradrenalin und Dopamin ab. Eine Dysbalance dieser kann zu affektiven Phasen der BD führen.

Durch eine Anstauung fehlgefalteter und ungefalteter Proteine kommt es zum ER-Stress. Die in Folge aktivierte Unfolded Protein Response (UPR) repariert die Zelle oder leitet eine Apoptose ein. Diese Arbeit untersucht Schlüsselgene der UPR, nämlich das Chaperon *Binding immunoglobulin protein (BiP)* und *C/EBP homologous protein (CHOP)*, welches eine Apoptose einleitet.

*Methoden:* *ARNTL*, *MAO-A*, *BiP* und *CHOP* wurden mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR, engl. quantitative polymerase chain reaction) untersucht. Die Expression der genannten Gene wurde zwischen der BD- ( $n = 81$ ) und der Kontrollgruppe ( $n = 54$ ) verglichen. Außerdem wurden die Genexpressionsunterschiede in den verschiedenen Phasen der BD (depressiv:  $n = 23$ , manisch:  $n = 10$ , euthym:  $n = 46$ ) analysiert. Ebenso wurde untersucht, ob die Genexpression von ER-Parametern, *ARNTL* und *MAO-A* korrelieren.

*Ergebnisse:* Die BD-Gruppe hatte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant höhere *BiP*-Expression im peripheren Blut ( $p = .01$ ). BD-PatientInnen in einer depressiven Phase verfügten des Weiteren über eine signifikant erniedrigte *ARNTL*-Expression im Vergleich zur euthymen Gruppe ( $p = .047$ ). Die Genexpression von *ARNTL* korrelierte positiv mit *MAO-A* ( $p < .001$ ) und *BiP* ( $p =$

.02). Die Nullhypothesen der weiteren Fragestellungen konnten gegen die Erwartungen nicht verworfen werden.

*Konklusion:* Ein veränderter circadianer Rhythmus und Veränderungen der UPR scheinen eine entscheidende Rolle der Pathogenese der BD zu spielen. Die Genexpressionsergebnisse zeigen erstmalig eine Verbindung der molekularen Uhr und der Stimmungsregulation auf Genexpressionsebene im peripheren Blut von BD-StudienteilnehmerInnen. Des Weiteren verdeutlichen die Resultate eine Verbindung zwischen dem ER-Stress und dem circadianen Rhythmus.

## Abstract

*Introduction:* The presented final thesis focuses on two main topics: the molecular clock and the endoplasmic reticulum stress (ER stress) in connection with bipolar disorder (BD).

Bipolar patients often suffer from disturbed circadian rhythms. The circadian timekeeping is based on the rhythmic expression of clock genes. This final thesis analyses *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (ARNTL)*, one of the essential clock genes, and *monoamine oxidase A (MAO-A)*. The latter represents the connection between the molecular clock and mood regulation, since ARNTL activates MAO-A. The enzyme *monoamine oxidase A* degrades the neurotransmitters serotonin, noradrenalin and dopamine. A dysbalance of these can lead to affective episodes of BD.

An accumulation of misfolded and unfolded proteins leads to ER stress. The thereby activated Unfolded Protein Response (UPR) repairs the cell or initiates apoptosis. This study investigates major players of the UPR, namely the chaperone *Binding immunoglobulin protein (BiP)* and *C/EBP homologous protein (CHOP)*, which leads to apoptosis.

*Methods:* *ARNTL*, *MAOA*, *BiP* and *CHOP* were analysed with a quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The expression of these genes was analysed in patients with BD ( $n = 81$ ) and the control group ( $n = 54$ ). Gene expression differences were also measured in different affective episodes (depression:  $n = 23$ , mania:  $n = 10$  and euthymia:  $n = 46$ ). Furthermore, a possible correlation of *ARNTL*, *MAOA*, *BiP* and *CHOP* was investigated.

*Results:* BD patients had a significantly higher expression of *BiP* in peripheral blood ( $p = .01$ ). Furthermore, the expression of *ARNTL* was significantly lower in depressed BD patients compared to euthymic patients ( $p = .047$ ). The expression of *ARNTL* correlated positively with *MAO-A* ( $p < .001$ ) and with *BiP* ( $p = .02$ ). The other null hypothesis could not be rejected.

*Conclusion:* Disturbed circadian rhythms and alterations in the UPR seem to play a major role in the disease's pathogenesis. For the first time, the gene expression results display the connection between the molecular clock and mood regulation on gene expression level in peripheral blood of study participants with BD. Furthermore, the results show the connection between ER stress pathways and circadian rhythms.

# Inhaltsverzeichnis

Danksagungen .....	4
Zusammenfassung .....	5
Abstract.....	7
Glossar und Abkürzungen .....	11
Abbildungsverzeichnis .....	14
Tabellenverzeichnis.....	15
1 Einleitung.....	16
1.1 Die bipolare Erkrankung.....	16
1.1.1 Definition, Einteilung und Symptome.....	16
1.1.2 Epidemiologie.....	21
1.1.3 Ätiologie .....	21
1.1.4 Prognose und Krankheitsverlauf .....	23
1.1.5 Behandlung.....	24
1.2 Die molekulare Uhr.....	26
1.2.1 Uhrengene und die bipolare Erkrankung.....	31
1.3 <i>MAO-A</i> und die bipolare Erkrankung .....	35
1.4 ER-Stress .....	37
1.4.1 ER-Stress und die bipolare Erkrankung .....	42
1.5 Hypothesen und Ziele der Studie.....	45
2 Material und Methoden.....	46
2.1 Studiendesign.....	46
2.2 Workflow .....	47
2.3 Hintergrundwissen .....	48
2.3.1 PBMC-Isolation mit Ficoll-Histopaque® .....	48
2.3.2 cDNA-Synthese .....	49
2.3.3 qPCR.....	50
2.4 Durchführung.....	58
2.4.1 Blutentnahmen.....	58
2.4.2 PBMC-Isolation mit Ficoll-Histopaque® .....	58
2.4.3 RNA-Isolation mit TRI Reagent RT® .....	59
2.4.4 cDNA-Synthese mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems/Thermo Fisher .....	59
2.4.5 qPCR.....	63
2.5 Statistische Analyse .....	67
3 Ergebnisse – Resultate .....	69
3.1 Kohortenbeschreibung .....	69

3.2	Hypothese 1 „Bei BD kommt es zu einer signifikant erniedrigten Expression von <i>ARNTL</i> und <i>MAO-A</i> im Vergleich zu gesunden Kontrollen“ .....	71
3.2.1	Hypothese 1a „In affektiven Phasen der BD kommt es zu einer signifikant erniedrigten Expression von <i>ARNTL</i> und <i>MAO-A</i> im Vergleich zur euthymen Phase“	73
3.3	Hypothese 2 „Bei BD kommt es zu einer signifikant erhöhten Expression von <i>BiP</i> im Vergleich zu gesunden Kontrollen“ und Hypothese 3 „Bei BD kommt es zu einer signifikant erniedrigten Expression von <i>CHOP</i> im Vergleich zu gesunden Kontrollen“	75
3.3.1	Hypothese 2a „In affektiven Phasen der BD kommt es zu einer signifikant erhöhten Expression von <i>BiP</i> im Vergleich zur euthymen Phase“ und Hypothese 3a „In affektiven Phasen der BD kommt es zu einer signifikant erhöhten Expression von <i>CHOP</i> im Vergleich zur euthymen Phase“ .....	78
3.4	Korrelation .....	80
4	Diskussion.....	82
4.1	Diskussion der Ergebnisse .....	82
4.2	Limitationen und Stärken der Studie .....	86
4.3	Konklusion.....	89
5	Literaturverzeichnis .....	91
6	Anhang.....	109
6.1	PBMC-Isolierung.....	109
6.2	RNA-Isolation mittels Tri Reagent RT®: Standard Operating Procedures (SOP) des Instituts für Pathophysiologie und Immunologie der Medizinischen Universität Graz, Österreich .....	109

## Glossar und Abkürzungen

**ANCOVA:** Kovarianzanalyse (engl. „Analysis of covariance“)

**ARNTL:** Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like

**ATF4:** *Activating transcription factor 4*

**ATF6:** *Activating transcription factor 6*

**ATPase:** Adenosintriphosphatase

**BAX:** *BCL2 associated X*

**Bcl-2:** *B-cell lymphoma 2*

**Bcl-X:** *B-cell lymphoma X*

**BD:** Bipolare affektive Erkrankung (engl. „bipolar disorder“)

**BiP:** *Binding immunoglobulin protein*

**Ca<sup>2+</sup>:** Calcium-Ion

**CCG:** uhrenkontrollierte Gene (engl. „Clock-controlled Genes“)

**cDNA:** copy Desoxyribonukleinsäure (engl. „copy deoxyribonucleic acid“)

**CHOP:** *C/EBP homologous protein*

**CLOCK:** *Circadian locomotor output cycles kaput*

**CMF-PBS:** Calcium and Magnesium Free Phosphate Buffered Saline

**COPD:** chronisch obstruktive Lungenerkrankung

(engl. „Chronic obstructive pulmonary disease“)

**C<sub>q</sub>:** Quantification Cycle

**CREB:** *cAMP response element-binding protein*

**CRY1:** *Cryptochrome 1*

**CRY2:** *Cryptochrome 2*

**CSNK1E:** *Casein-Kinase 1 epsilon*

**dC<sub>q</sub>:** DeltaC<sub>q</sub>

**DNA:** Desoxyribonukleinsäure (engl. „Deoxyribonucleic acid“)

**dNTPs:** Desoxyribonukleotidtriphosphate

**DOC1/4/6:** *Downstream von CHOP 1, Downstream von CHOP 4, Downstream von CHOP 6*

**DSM-IV:** 4. Version des diagnostischen und statistischen Leitfadens psychischer Störungen (engl. „Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders“)

**dt:** Deutsch

**eIF2 $\alpha$ :** *eukaryotic Initiation Factor of Translation*

**eIF2 $\alpha$ -P:** phosphoryliertes eIF2 $\alpha$

**Engl.:** Englisch

**ER:** Endoplasmatisches Retikulum

**ERAD:** ER-assoziierte Proteindegradierung

(engl. „ER associated protein degradation“)

**ERO1 $\alpha$ :** ER-Oxidase 1 $\alpha$

**ER-Stress:** Stress des Endoplasmatischen Retikulums

**GADD34:** *Growth arrest and DNA damage-inducible protein 34*

**GRP94:** *Glucose-regulated protein 94*

**GSK-3 $\beta$ :** *Glykogen-Synthase-Kinase 3 beta*

**GWAS:** Genomweite Assoziationsstudien

(engl. „Genome-wide association studies“)

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Wasserstoffperoxid

**HAMD:** Hamilton Rating Scale for Depression

**HIV:** Humaner Immundefizienz-Virus

**HPA-Achse:** Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse

(engl. „hypothalamic–pituitary–adrenal axis“)

**HPRT1:** *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1*

**ICD-10:** 10. Version der Internationalen Klassifikation von Krankheiten

(engl. „International Classification of Disease“)

**IRE1 $\alpha$ :** *Inositol-Requiring Protein 1 Alpha*

**JNK-Pathway:** c-Jun N-terminal kinase Pathway

**Konz.:** Konzentration

**MAO-A:** *Monoaminoxidase A*

**MAO-B:** *Monoaminoxidase B*

**MAO-Hemmer:** Monoaminoxidase-Hemmer

**min:** Minuten

**min.:** mindestens

**mRNA:** Boten-Ribonukleinsäure (engl. „messenger ribonucleic acid“)

**NPAS2:** *Neuronal PAS Domain Containing Protein 2* (PAS...period aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator single-minded domain)

**NTC:** No-Template-Control

**PBMCs:** mononukleären Zellen des peripheren Blutes

(engl. „peripheral blood mononuclear cells“)

**PER1-3:** *Period homolog 1-3*

**PERK:** *double stranded RNA dependent protein kinase like ER kinase*

**qPCR:** quantitative Polymerase-Kettenreaktion

(engl. „quantitative polymerase chain reaction“)

**Rev-erb $\alpha$ :** *syn. Nuclear receptor subfamily 1 group D member 1(NR1D1)*

**RHT:** Retinohypothalamischer Trakt

**RNA:** Ribonukleinsäure (engl. „ribonucleic acid“)

**RNase:** Ribonuklease

**RORE:** ROR-responsive element

**ROR $\alpha$ :** RAR-related orphan receptor  $\alpha$  (RAR...retinoic acid receptor)

**ROS:** reaktive Sauerstoffspezies (engl. „reactive oxygen species“)

**RT-:** reverse Transkriptase negative Proben

**RT:** reverse Transkriptase

**RT-PCR:** reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

(engl. „real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction“)

**SCID-I:** strukturierten klinischen Interview für DSM-IV (engl. „Structural Clinical Interviews“)

**SCN:** Suprachiasmatischer Nucleus

**SERCA2:** sarkoplasmatische/endoplasmatisches-Retikulum-Ca<sup>2+</sup>-ATPase 2

**SNPs:** Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. „single nucleotide polymorphisms“)

**SOP:** Standard Operating Procedure (dt. „Arbeitsanleitung“)

**SSRIs:** Serotonin-Wiederaufnahmehemmer

(engl. „selective serotonin reuptake inhibitors“)

**T<sub>m</sub>:** Schmelztemperatur

**TRB3:** *Tribbles-related protein 3*

**UPR:** Unfolded Protein Response (dt. „ungefaltete Protein Reaktion“)

**WHO:** Weltgesundheitsorganisation (engl. „World Health Organization“)

**XBP1:** *X-box binding protein 1*

**YMRS:** Young Mania Rating Scale

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Schematisierter Aufbau der molekularen Uhr.....	30
Abbildung 1-2 Schematisierter Aufbau der molekularen Uhr und ihrer Auswirkungen auf <i>MAO-A</i> .....	36
Abbildung 1-3 ER-Stressreaktion .....	41
Abbildung 2-1 Ficoll-Histopaque®-Dichtegradientenzentrifugation .....	48
Abbildung 2-2 Wirkmechanismus der TaqMan®-Probe .....	52
Abbildung 2-3 SYBR® Green-Wirkweise .....	54
Abbildung 2-4 Thermocyclerprogramm für <i>ARNTL</i> , <i>MAO-A</i> und dem ribosomalen Referenzgen <i>18s</i> .....	64
Abbildung 2-5 Thermocyclerprogramm für <i>CHOP</i> , <i>BiP</i> und <i>HPRT1</i> .....	66
Abbildung 3-1 Boxplot der Genexpression von <i>ARNTL</i> der BD- und Kontrollgruppe .....	71
Abbildung 3-2 Boxplot der Genexpression von <i>MAO-A</i> der BD- und Kontrollgruppe .....	72
Abbildung 3-3 Boxplot der Genexpression von <i>ARNTL</i> . Unterteilung der BD-Gruppe in eine euthyme, depressive sowie manische Gruppe.....	73
Abbildung 3-4 Boxplot der Genexpression von <i>MAO-A</i> . Unterteilung der BD-Gruppe in eine euthyme, depressive sowie manische Gruppe.....	74
Abbildung 3-6 Boxplot der Genexpression von <i>BiP</i> .....	76
Abbildung 3-5 Boxplot der Genexpression von <i>CHOP</i> .....	77
Abbildung 3-9 Boxplot der Genexpression von <i>BiP</i> . Unterteilung der BD-Gruppe in eine euthyme, depressive sowie manische Gruppe .....	78
Abbildung 3-8 Boxplot der Genexpression von <i>CHOP</i> . Unterteilung der BD-Gruppe in eine euthyme, depressive sowie manische Gruppe .....	79
Abbildung 3-10 Streudiagramm der Genexpression von <i>ARNTL</i> und <i>MAO-A</i> .....	80
Abbildung 3-11 Streudiagramm der Genexpression von <i>ARNTL</i> und <i>BiP</i> .....	81

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1 Unterteilung der BD in Gruppen .....	17
Tabelle 1-2 Diagnosefindung der Manie und Hypomanie.....	18
Tabelle 1-3 Diagnosefindung der schweren Depression .....	20
Tabelle 1-4 Übersichtsdarstellung der Studien bezüglich der <i>CHOP</i> - und <i>BiP</i> - Expression im peripheren Blut nach ER-Stressinduktion .....	44
Tabelle 1-5 Übersichtsdarstellung der Studien bezüglich der Genexpression von <i>CHOP</i> und <i>BiP</i> im peripheren Blut ohne ER-Stressinduktion .....	44
Tabelle 2-1 Mischungsverhältnis von nukleasefreiem Wasser und RNA .....	60
Tabelle 2-2 Volumina des Mastermixes für die cDNA-Synthese .....	61
Tabelle 2-3 RT- Pipettierschema.....	62
Tabelle 2-4 Thermocycler-Programm der cDNA-Synthese .....	62
Tabelle 2-5 Pipettierschema der qPCR mit TaqMan® zur Analyse von <i>ARNTL</i> , <i>MAO-A</i> sowie dem ribosomalen Referenzgen 18s.....	63
Tabelle 2-6 Volumina des Mastermixes für die qPCR von <i>ARNTL</i> , <i>MAO-A</i> sowie dem ribosomalen Referenzgen 18s.....	64
Tabelle 2-7 Pipettierschema der qPCR von <i>CHOP</i> , <i>BiP</i> sowie dem Referenzgen <i>HPRT1</i> .....	65
Tabelle 2-8 Volumina des Mastermixes für die qPCR von <i>CHOP</i> , <i>BiP</i> sowie dem Referenzgen <i>HPRT1</i> .....	65
Tabelle 2-9 Primersequenzen von <i>CHOP</i> , <i>BiP</i> und <i>HPRT1</i> .....	66
Tabelle 3-1 Kohortenanalyse der BD- und Kontrollgruppe .....	69
Tabelle 3-2 Kohortenanalyse der verschiedenen Phasen der BD .....	70
Tabelle 6-1 Mischungsverhältnisse zum Herstellen von CMF-PBS.....	109

# 1 Einleitung

## 1.1 Die bipolare Erkrankung

Die BD ist eine chronische Erkrankung, bei der Betroffene neben euthymen Perioden (ausgeglichene Stimmungslage) manische und depressive Phasen erleiden (Tölle & Windgassen 2014). Die Sterblichkeit von BD-PatientInnen ist sowohl durch Suizide als auch somatische Begleiterkrankungen erhöht. Dazu kommt, dass BD-PatientInnen statistisch gesehen eine signifikant reduzierte Lebensqualität aufweisen, was einerseits durch die Erkrankung an sich und andererseits durch Begleiterkrankungen erklärt werden kann. Des Weiteren ist zu beachten, dass die medikamentöse Therapie durch etwaige Nebenwirkungen negative Auswirkungen auf das alltägliche Leben (z.B. durch Auftreten von Müdigkeit) oder die somatische Situation der PatientInnen haben kann. Die Schwierigkeit, soziale Beziehungen aufrecht zu erhalten, mit Geld umzugehen und adäquat auf Ausnahmesituationen zu reagieren, trägt zusätzlich zu einer reduzierten Lebensqualität bei (Young & Grunze 2013). Nicht zu vergessen ist auch das Stigma psychiatrischer Erkrankungen in der Gesellschaft, das sich in den letzten Jahren zwar vermindert hat, aber nicht verschwunden ist.

Um diesen Problemen entgegenzuwirken ist es von enormer Bedeutung, die Pathomechanismen der BD ganzheitlich zu verstehen und auf diese Weise die Behandlung und Prävention optimieren zu können. Der wissenschaftliche Konsens geht heute pathogenetisch vom Vulnerabilitäts-Stress-Modell aus – polygene Risikofaktoren und chronischer Stress in Kombination mit Episoden auslösenden Triggern führen zu affektiven Episoden. Unter anderem wird eine Störung der circadianen Uhr und des ER-Stress, bei dem es zu einer Anstauung fehlgefalteter Proteine kommt, diskutiert. Diese Arbeit zielt auf das Verständnis der molekularen Uhr und des ER-Stress im Zusammenhang mit BD ab.

### 1.1.1 Definition, Einteilung und Symptome

Die BD gehört zum Formenkreis der affektiven Erkrankungen, zu denen ebenfalls unipolare Verläufe einer Depression oder Manie zählen. Im Gegensatz zu

unipolaren affektiven Erkrankungen kommt es bei der BD zum Auftreten sowohl depressiver als auch manischer Phasen. Neben den affektiven Phasen kann es auch euthyme Intervalle geben (Tölle & Windgassen 2014; Jann 2014).

Die BD wird in der zehnten Version der Internationalen Klassifikation von Krankheiten der WHO (ICD-10, engl. „International Classification of Disease“) wie folgt definiert:

„Eine Erkrankung mit zwei oder mehr Episoden, in denen die Stimmungslage und das Aktivitätsniveau der Betroffenen deutlich gestört sind. Zu einigen Gegebenheiten treten bei dieser Erkrankung eine gehobene Stimmung und ein erhöhtes Energie- und Aktivitätslevel auf (Hypomanie oder Manie), an anderen eine gesenkte Stimmungslage sowie verminderte Energie und Aktivität (Depression)“ - (World Health Organisation 2016; Tölle & Windgassen 2014).

Neben einer Änderung der Stimmung und Befindlichkeit, des Antriebes und der Affizierbarkeit kommt es des Weiteren zu einem veränderten Biorhythmus (Lenz & Küfferle 2008; Gastpar et al. 2003).

*Tabelle 1-1 Unterteilung der BD in Gruppen* (Rothenhäusler & Täschner 2013; Saß et al. 2003; Young & Grunze 2013; Arolt et al. 2011)

Gruppen der BD	
<b>Bipolar-I-Störung:</b>	zumindest eine manische oder gemischte Episode, zudem (meist) Auftreten von depressiven Phasen
<b>Bipolar-II-Störung:</b>	eine oder mehrere Episoden einer schweren Depression und mindestens eine hypomane Episode
<b>Nicht bezeichnete Störung:</b>	<b>näher bipolare</b> Erkrankung mit bipolaren Merkmalen (Stimmungslabilität, Hypomanie, depressive Phasen), die aufgrund ihrer zeitlichen Dauer und/oder Intensität nicht die Kriterien der Bipolar-II-Störung erfüllen

<b>Zyklothyme Störung:</b>	zahlreiche depressive und hypomane Episoden über einen Zeitraum von zwei Jahren, die nicht die Kriterien einer schweren Depression oder Manie erfüllen, symptomfreies Intervall unter zwei Monaten
----------------------------	--

### 1.1.1.1 Manie und Hypomanie

Das Hauptmerkmal der Manie ist eine gehobene und/oder gereizte Stimmungslage über den Zeitraum von mindestens einer Woche (Lenz & Küfferle 2008; American Psychiatric Association 2000). Schon beim Auftreten einer manischen Phase geht die 4. Version des diagnostischen und statistischen Leitfadens psychischer Störungen (DSM-IV, engl. „Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders“) von einer BD aus (Gastpar et al. 2003). Folgend sind die diagnostischen Leitlinien für die Diagnose einer Manie nach DSM-IV zusammengefasst:

*Table 1-2 Diagnosefindung der Manie und Hypomanie (Möller 2015; American Psychiatric Association 2000).*

Manie	Hypomanie
Abnorme, anhaltend gehobene oder gereizte Stimmung und gesteigerte Aktivität, die klar von der normalen Stimmung des Betroffenen abgrenzbar ist	Abnorme, anhaltend gehobene oder gereizte Stimmung und gesteigerte Aktivität, die klar von der normalen Stimmung des Betroffenen abgrenzbar ist
min. eine Woche	min. vier aufeinanderfolgende Tage
Min. drei (bzw. vier bei alleiniger gereizter Stimmung) der folgenden Symptome müssen erfüllt sein:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erhöhtes Selbstwertgefühl und/oder Größenideen</li> <li>• Vermindertenes Schlafbedürfnis</li> <li>• Logorrhoe</li> <li>• Ideenflucht oder Gedankenrasen</li> <li>• Erhöhte Ablenkbarkeit</li> <li>• Gesteigerte, zielgerichtete Aktivität oder psychomotorische Unruhe</li> </ul>	

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vermehrte Teilnahme an freudvollen Aktivitäten, die zu unangenehmen Konsequenzen führen (z.B. unbedachte Investitionen)</li> </ul>	
Beeinträchtigung der sozialen oder beruflichen Funktionstüchtigkeit, Hospitalisierung oder psychotische Symptome	Für den/die PatientIn untypische Veränderungen des Funktionsniveaus und der Stimmung, die für andere beobachtbar sind
Enthemmtes, risikoreiches Verhalten (z.B. schnelles Autofahren, unbedachte Geldausgaben,...)	Kein völlig enthemmtes, risikoreiches Verhalten
Symptome sind nicht durch Substanzwirkung oder eine somatischen Grundlage erklärbar	

Die Konzentration und Aufmerksamkeit können gesenkt sein, das Interesse an der Aktivität ist aber im Gegensatz zur Depression meist gesteigert (Gastpar et al. 2003).

Die pathologische Ausprägung der Hypomanie ist nicht immer eindeutig. Hinweisend auf eine hypomane Episode sind persönlichkeitsfremde, übersteigerte Verhaltensmuster (Möller 2015). Im Gegensatz zur manischen Phase ist es PatientInnen in der Hypomanie oft möglich, ihr Sozial- und Arbeitsleben zu erhalten (Gastpar et al. 2003). Oft wird die Hypomanie selbst nicht wahrgenommen und ist nur durch eine Fremdanamnese diagnostizierbar (Möller 2015).

### 1.1.1.2 Depression

Die Depression ist durch eine gedrückte Stimmungslage und Antriebsverminderung gekennzeichnet (Lenz & Küfferle 2008). In der folgenden Tabelle werden die Diagnosekriterien für eine Depression nach DSM-IV zusammengefasst:

*Tabelle 1-3 Diagnosefindung der schweren Depression* (Möller 2015; American Psychiatric Association 2000)

Schwere Depression
depressive Verstimmung oder Interessens- und Freudverlust
Zusätzlich müssen min. 5 der folgenden Symptome über einen Zeitraum von 2 Wochen bestehen:
<ul style="list-style-type: none"><li>• Gedrückte Stimmung, die fast den ganzen Tag anhält</li><li>• Vermindertes Interesse und Anhedonie</li><li>• Deutliche Veränderungen des Körpergewichts</li><li>• Insomnie oder Hypersomnie</li><li>• Psychomotorische Unruhe oder Verlangsamung</li><li>• Müdigkeit oder Energieverlust</li><li>• Wertlosigkeitsgefühle oder inadäquate Schuldgefühle</li><li>• Verminderte Denk-, Konzentrations- und/oder Entscheidungsfähigkeit</li><li>• Suizidgedanken, Suizidpläne, Suizidversuche</li></ul>
Klinisch bedeutsames Leiden, soziale oder berufliche Beeinträchtigung
Die Symptome lassen sich nicht auf Trauer (z.B. nach Verlusten geliebter Menschen) zurückführen
Symptome sind nicht durch Substanzwirkung oder eine somatischen Grundlage erklärbar

### 1.1.1.3 Gemischte Episoden

Meist treten gemischte Episoden beim Übergang der beiden Extreme – Depression und Manie – auf, können aber auch als isolierte, eigene Phase bestehen. Charakteristisch ist ein zeitgleiches Auftreten manischer und depressiver Symptome fast jeden Tag über mindestens eine Woche. So kann beispielsweise eine gesteigerte Stimmungslage mit einer Antriebs- und Denklähmung assoziiert sein, einem sogenannten manischen Stupor (Tölle & Windgassen 2014; American Psychiatric Association 2000).

### **1.1.2 Epidemiologie**

Rothenhäusler und Täschner geben die Prävalenz der BD für Bipolar-I-Erkrankungen mit 0,3 - 1,5% und für Bipolar-II-Erkrankungen mit 5,5% an. Diese liegen unter der Lebenszeitprävalenz unipolarer Verläufe (Rothenhäusler & Täschner 2013). Es ist allerdings zu beachten, dass in der Literatur für die BD sehr unterschiedliche Prävalenzwerte angegeben werden. Carlborg et al. (2015) gibt eine Lebenszeitprävalenz von 1 - 2,4% an. Im Allgemeinen wird von einer höheren Prävalenz ausgegangen, da BD generell unterdiagnostiziert wird (Carlborg et al. 2015). Die Unterdiagnostizierung kann einerseits durch Fehldiagnosen (z. B. als unipolare Depression) erklärt werden und andererseits durch das erschwerte Abgrenzen zu nicht pathologischen Persönlichkeitszügen. Gerade bei leicht ausgeprägten hypomanen Phasen wird die BD oft fälschlicherweise als unipolare Depression diagnostiziert (Carlborg et al. 2015; Young & Grunze 2013). Das Erkrankungsverhältnis von Mann und Frau ist ausgeglichen. Im Gegensatz zur Depression ist die Erkrankungswahrscheinlichkeit in unteren sozialen Schichten nicht erhöht (Lenz & Küfferle 2008).

### **1.1.3 Ätiologie**

Die Entstehung der BD ist auf eine multifaktorielle Genese zurückzuführen. Nach dem Vulnerabilitäts-Stress-Modell führt Distress zu biologischen Veränderungen, wie beispielsweise epigenetischen Veränderungen und/oder einer Dysregulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse, engl. „hypothalamic–pituitary–adrenal axis“), die bei einer vorliegenden genetischen Prädisposition zum Ausbrechen der Erkrankung führen (Jaworska-Andryszewska & Rybakowski 2016; Miklowitz & Chang 2008).

Noch nicht alle Wege der Krankheitsentstehung sind erforscht. Um die Erkrankung ganzheitlich therapieren zu können, ist es von enormer Bedeutung, die Pathogenese weiter zu untersuchen und zu verstehen.

#### **1.1.3.1 Genetik**

Die BD weist einen starken Zusammenhang mit genetischen Faktoren auf. Man geht im Gegensatz zu unipolaren affektiven Erkrankungen von einer geringeren

psychosozialen Komponente der Pathogenese aus (Rothenhäusler & Täschner 2013). Bei erkrankten Verwandten ersten Grades steigt die Wahrscheinlichkeit an BD zu erkranken auf ein 10-faches der Allgemeinbevölkerung an. Bei monozygoten Zwillingen liegt die Konkordanzrate bei 80%, bei dizygoten hingegen nur bei 20%. Dies lässt auf eine genetische Komponente schließen. Es wird von einem polygenen Erbgang ausgegangen (Möller 2015; Tölle & Windgassen 2014). Interessanterweise wurden auch bei den in dieser Diplomarbeit untersuchten Genen (*ARNTL*, *MAO-A* und *BiP*) bereits in der Literatur genetische als auch epigenetische Veränderungen bei BD beschrieben (Bengesser & Reininghaus 2013; Mansour et al. 2006; Bengesser, Reininghaus, et al. 2016; Kakiuchi et al. 2005; Le-Niculescu et al. 2009).

### **1.1.3.2 Neurobiologische Faktoren**

Eine Balancestörung verschiedener Neurotransmitter zählt zu den neurobiologischen Faktoren, die zur Entstehung der BD beitragen. Sehr vereinfacht ausgedrückt, vermutet man bei der Depression eine Verminderung an Serotonin, Dopamin und Noradrenalin. Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRIs, engl. „selective serotonin reuptake inhibitors“) und Monoaminoxidase-Hemmer (*MAO*-Hemmer) greifen in dieses Ungleichgewicht ein und führen zu einer erhöhten Konzentration der beiden Neurotransmitter im synaptischen Spalt. Bei der Manie vermutet man ein Überangebot an Dopamin und Noradrenalin (Lenz & Küfferle 2008). Die Synthese und Sekretion von Serotonin, Noradrenalin und Dopamin unterliegt dabei dem circadianen Rhythmus, was für diese Diplomarbeit von besonderer Relevanz ist (McClung 2007b; McClung 2007a).

### **1.1.3.3 Neuroanatomische Faktoren**

Durch strukturelle und funktionelle Bildgebung konnten Veränderungen der Hirnstruktur bei BD festgestellt werden (Blond et al. 2012). So konnte eine verminderte Konnektivität zwischen limbischen Gehirnstrukturen, allen voran der Amygdala, und dem ventralen präfrontalen Kortex festgestellt werden (Strakowski et al. 2012). Bei unbehandelten PatientInnen kommt es zu einer Verminderung des Volumens und gleichermaßen zu einer vermehrten Aktivität der Amygdala (Blond et al. 2012). Des Weiteren werden eine Ventrikelerweiterung, Reduktion

der grauen Substanz und Hippokampusdegeneration beschrieben (Möller 2015). Insgesamt gibt es sehr viele cross-sectionale Neuroimaging-Studien mit nicht immer einheitlichen Ergebnissen. Longitudinale Studien sind in der Literatur kaum zu finden.

#### **1.1.3.4 Psychoneuroendokrinologie**

Die psychoneuroendokrine Komponente der Pathogenese der BD weist auf eine Dysregulation der HPA-Achse hin. Es kommt zu einer überschießenden Stresshormonreaktion bei gestörtem Feedback-Mechanismus (Möller 2015; Murri et al. 2016). Bei BD liegen erhöhte Cortisolwerte im Blut vor (Murri et al. 2016). Dabei geht die typische Tagesrhythmik der Sekretion verloren. Dies lässt auf eine Fehlfunktion der inneren molekularen Uhr schließen (McQuade & Young 2000; McClung 2007a).

#### **1.1.3.5 Circadiane Rhythmik und ER-Stress**

Anhaltspunkte für eine Assoziation der circadianen Rhythmik und dem ER-Stress mit der BD werden in den Kapiteln 1.2.1 „Uhrengene und die bipolare Erkrankung“ und 1.4.1 „ER-Stress und die bipolare Erkrankung“ näher beschrieben.

#### **1.1.4 Prognose und Krankheitsverlauf**

Das Erstmanifestationsalter liegt zwischen dem 25. und 30. Lebensjahr und ist somit geringer als bei der unipolaren Depression (Gastpar et al. 2003; Rothenhäusler & Täschner 2013). Unbehandelt kommt es mit Fortschreiten der Erkrankung zu einem vermehrten Auftreten affektiver Phasen mit immer kürzer werdenden euthymen Intervallen (Möller 2015). In Langzeitstudien starben bis zu 11% der PatientInnen an Suizid, ein Drittel übte mindestens einen Suizidversuch in ihrem Leben aus. Bezieht man frühere Suizidversuche, die nicht zu einem Kontakt mit dem Gesundheitssystem führten mit ein, steigt die Zahl weiter an (Pallaskorpi et al. 2017). Die Sterblichkeitsrate ist neben Suiziden durch eine Reihe weiterer Faktoren wie Unfälle, Substanzmissbrauch sowie Begleiterkrankungen erhöht (Angst et al. 2002). Zu den Begleiterkrankungen zählen beispielsweise das metabolische Syndrom, kardio- sowie zerebrovaskuläre

und respiratorische Erkrankungen (Carlborg et al. 2015; Young & Grunze 2013; Jann 2014; Angst et al. 2002). Die Prognose ist individuell sehr unterschiedlich, kann aber vor allem durch frühzeitige therapeutische Maßnahmen und aktive psychoedukative Strategien positiv beeinflusst werden (Gastpar et al. 2003). Durch eine Kombination von regelmäßig eingenommener Medikation und weiteren Therapiemöglichkeiten wie gezielter Psychoedukation kann diese chronische Erkrankung in vielen Fällen besser unter Kontrolle gebracht und die Lebensqualität der Betroffenen wiederhergestellt werden.

### **1.1.5 Behandlung**

Die Behandlung der BD ist aufgrund des chronischen Verlaufes und der Schwankungen zwischen den beiden Extremen Manie und Depression schwierig. Der Therapieerfolg ist geringer als bei einer schweren unipolaren Depression (Jann 2014). Die BD kann als lebenslang bestehende, chronische Krankheit bezeichnet werden. Die Therapie lässt sich in eine akute Behandlung der Depression oder der Manie und eine Rezidivprophylaxe mit Phasenprophylaktika unterteilen (Belmaker 2004; Rothenhäusler & Täschner 2013; Möller 2015). Eine medikamentöse Überführung der Depression in eine Manie oder umgekehrt, das sogenannte "Switchen", ist bei der Therapie zu beachten und sollte nach Möglichkeit vermieden werden (Möller 2015).

#### **1.1.5.1 Medikamentöse Behandlung**

Das effektivste Phasenprophylaktikum ist Lithium (Geddes & Miklowitz 2013). Lithium senkt sowohl die Häufigkeit als auch die Länge der affektiven Phasen (Shan et al. 2016). Des Weiteren sinkt das Suizidrisiko unter Lithiumtherapie um 80% (Baldessarini et al. 2006). Die beiden Phasenprophylaktika Lithium und Valproat beeinflussen sowohl die innere molekulare Uhr als auch den ER-Stress. Lithium, und zu einem geringeren Anteil auch Valproat, inhibiert die Glykogen-Synthase-Kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), einen Bestandteil der inneren molekularen Uhr (Valvassori et al. 2017; Lamont et al. 2010). Lithium degradiert außerdem *Nuclear receptor subfamily 1 group D member 1* (*Rev-erba*) und führt zu einer vermehrten Expression von *ARNTL* (Yin et al. 2006). Des Weiteren wirken Lithium und Valproat positiv regulatorisch auf die beiden Chaperone *BiP* und *Glucose-*

*regulated protein 94 (GRP94)*, die dem ER-Stress entgegenwirken (Kakiuchi et al. 2009; Chen et al. 2000; Shao et al. 2005). Valproat unterdrückt außerdem das proapoptotische *CHOP* (Li et al. 2017).

Nicht zu vergessen sind aber auch die möglichen Nebenwirkungen von Lithium, nämlich Polyurie sowie Polydipsie, Gewichtszunahme, gastrointestinale Nebenwirkungen und ein feinschlägiger Tremor. Des Weiteren ist die therapeutische Breite von Lithium gering, weshalb regelmäßige Blutspiegelkontrollen erforderlich sind (Dellas 2011; Shan et al. 2016).

Neben Lithium werden außerdem Antikonvulsiva, Antipsychotika und Antidepressiva zur Behandlung der BD eingesetzt (Jann 2014; Geddes & Miklowitz 2013).

### **1.1.5.2 Nicht medikamentöse Behandlung**

Für eine optimale Therapieeinstellung sollte eine medikamentöse Therapie mit einer nicht medikamentösen Therapie kombiniert werden. Einen wichtigen Grundpfeiler stellt die Psychotherapie dar, hier im Speziellen die kognitive Therapie und die Psychoedukation (Geddes & Miklowitz 2013; Möller 2015).

Von besonderer Relevanz für diese Studie ist, dass viele Therapiemöglichkeiten der BD erfolgreich in die molekulare Uhr eingreifen. Sie werden als chronotherapeutische Interventionen zusammengefasst (Lamont et al. 2010). Schlafentzugstherapien und Lichttherapien bewirken eine neuerliche Einstellung der molekularen Uhr (McClung 2007a). Verlängerte Bettperioden in Dunkelheit (Dunkeltherapie) wirken antimenschlich (Barbini et al. 2005; Wehr et al. 1998). Bei der interpersonellen und sozialen Rhythmustherapie wird ein Zeitplan gemeinsam mit dem/der PatientIn erstellt, der einen geregelten Tagesablauf ermöglichen soll. Beispielsweise werden die Schlafenszeit und Sportzeiten im Zeitplan festgelegt. Diese Regelmäßigkeiten im Tagesablauf senken die Rezidivwahrscheinlichkeit (Frank 2007; Geddes & Miklowitz 2013; Frank et al. 2005). Die interpersonelle Psychotherapie hilft bei der Bewältigung psychosozialer Stressoren, wie beispielsweise Rollenkonflikten (Möller 2015).

## **1.2 Die molekulare Uhr**

Die innere molekulare Uhr regelt den körpereigenen Rhythmus und stimmt ihn mit externen Stimuli überein. Auf diese Weise wird eine bestmögliche Anpassung der körpereigenen Prozesse an Tages- und Nachtphasen ermöglicht. Durch eine Übereinstimmung der inneren molekularen Uhr mit der Umwelt ist eine Anpassung an diese möglich, was einen entscheidenden Selektionsvorteil mit sich bringt. Aus diesem Grund verfügen nahezu alle bekannten Lebewesen (Eukaryoten und Bakterien) über einen inneren „Zeitgeber“ (Lowrey & Takahashi 2004). Eine Entstehungstheorie besagt, dass mithilfe der inneren molekularen Uhr die vulnerable Phase der Desoxyribonukleinsäure (DNA, engl. „Deoxyribonucleic acid“) -Synthese vermehrt in der Nacht stattfinden kann, was zu weniger Zellschäden und damit für den Organismus vorteilhaft ist. Nachts finden hauptsächlich anabole Prozesse statt, wohingegen am Tag katabole Prozesse ablaufen (Lowrey & Takahashi 2004; Hastings et al. 2003). Der Schlafrhythmus, aber auch etliche endokrine, metabolische als auch immunologische Prozesse werden durch die innere molekulare Uhr bestimmt (Charrier et al. 2017). Spezifisch werden die Körpertemperatur, die Cortisol- und Melatoninproduktion, der Blutzuckerwert, der Blutdruck, aber auch Neurotransmittermengen von der molekularen Uhr beeinflusst. Veränderungen der inneren molekularen Uhr führen zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für Krebserkrankungen, Diabetes, Adipositas und affektive Störungen (Valenzuela et al. 2016; Agostinelli et al. 2016).

Das Zentrum der internen Zeitgebung (die sogenannte „Master-Clock“) befindet sich im Suprachiasmatischen Nucleus (SCN) des Hypothalamus (Shearman et al. 2000). Das Geflecht aus Nervenzellen im SCN übernimmt die Funktion eines circadianen Oszillators (Porterfield & Mintz 2009). Bei dem wohl bedeutendsten äußeren Faktor, der die molekulare Uhr beeinflusst, handelt es sich um Licht (Charrier et al. 2017). Neben dem Stäbchen- und Zapfensystem zur visuellen Informationsdetektion gibt es eine weitere Form von retinalen Ganglienzellen, die bei Lichteinwirkung depolarisieren und zu einer Freisetzung von Melanopsin führen (Hastings et al. 2003). Melanopsin wiederum führt zu einer Aktivierung von Glutamat, welches als primärer Neurotransmitter des Retinohypothalamischen Trakts (RHT) fungiert (Porterfield & Mintz 2009; Travnickova-Bendova et al. 2002). Der RHT stellt eine direkte, monosynaptische Informationsverbindung zwischen

der Netzhaut und dem SCN her (Abrahamson & Moore 2001; Crosio et al. 2000). Besonders eindrucksvoll ist die Anpassung der inneren molekularen Uhr an die Außenwelt bei den zweimal jährlich erfolgenden Zeitumstellungen zu beobachten. Im Oktober, wenn die Uhren um eine Stunde zurückversetzt werden, wachen viele Menschen bereits vor dem Läuten des Weckers auf, da sie noch an die bisherige Zeitgebung angepasst sind. Bereits innerhalb weniger Tage gleicht sich der innere Rhythmus jedoch wieder an die äußere Zeitgebung an (Dunlap 1999). Bemerkenswert ist, dass der SCN auch in kompletter Dunkelheit, ohne stimulierende Lichtreize, einen ungefähren 24-Stundenrhythmus beibehält (Crosio et al. 2000). Der Bereich der inneren molekularen Zeitgebung bei gesunden Erwachsenen liegt bei 24 Stunden und 11 Minuten mit einer Standardabweichung von 16 Minuten. Durch den Input externer Stimuli wird der körpereigene Rhythmus auf exakt 24 Stunden abgestimmt (Charrier et al. 2017). Eine Lichteinwirkung in der späten Nacht beschleunigt die innere molekulare Uhr, wohingegen Licht in der frühen Nacht den Rhythmus verzögert (Travnickova-Bendova et al. 2002). Die interne Zeitgebung des SCN ohne Einfluss äußerer Stimuli wird durch einen transkriptionalen-translationalen-Feedbackkreis ermöglicht, der anschließend noch ausführlicher beschrieben wird. Neben Licht gibt es noch weitere Zeitgeber wie soziale Einflüsse, die Außentemperatur oder körperliche Betätigung, die die molekulare Uhr beeinflussen, allerdings in einem weitaus geringeren Maß (Lowrey & Takahashi 2004). Dass Licht den primären Zeitgeber für Menschen darstellt, lässt sich gut an Schichtarbeitern erkennen. Selbst wenn diese ausschließlich in der Nacht arbeiten, kommt es zu einer fehlenden Anpassung des inneren Rhythmus (Mistlberger & Skene 2004). Bei manchen blinden Individuen scheint der Schlaf-Wach-Rhythmus zum primären Zeitgeber zu werden und ermöglicht auf diese Weise einen angepassten 24-Stundenrhythmus. Die genauen Mechanismen dieser Zeitgebung sind allerdings noch nicht bekannt (Klerman et al. 1998). Soziale Zeitgeber bei beidseitiger Enukleation konnten nicht nachgewiesen werden (Mistlberger & Skene 2004).

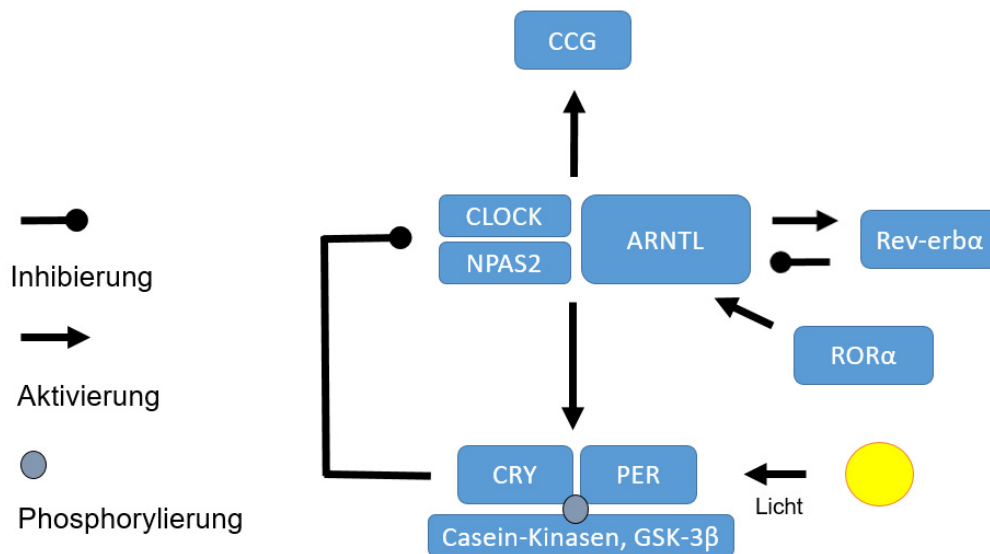
Neben dem SCN gibt es noch viele weitere periphere Zeitgeberzentren, sogenannte „Extra-SCN-Oszillatoren“ oder „Sklaven-Oszillatoren“. Diese sind allerdings auf Signale vom SCN angewiesen und verlieren nach 2-7 Tagen ihren eigenständigen 24-Stundenrhythmus. Es ist nach wie vor nicht vollständig geklärt, was den SCN von den peripheren Oszillatoren abhebt. Im Gegensatz zu den

peripheren Oszillatoren erhält der SCN durch den RHT direkt Informationen über den Lichtstand. Allerdings bleibt der Rhythmus des SCN selbst bei andauernder Dunkelheit erhalten und klingt im Gegensatz zu den peripheren Oszillatoren nicht ab. Es wird vermutet, dass im SCN andere Proteinkonzentrationen und kinetische Verhältnisse vorliegen als in den „Extra-SCN-Oszillatoren“ (Reppert & Weaver 2002; Crosio et al. 2000; Lowrey & Takahashi 2004). Ein wichtiger Botenstoff, der vom SCN angeregt wird und von der Glandula pinealis produziert wird, ist Melatonin. Dieses synchronisiert die „Extra-SCN-Oszillatoren“ und stellt einen wichtigen Regelmechanismus des Schlaf-Wach-Rhythmus dar (Charrier et al. 2017).

Die innere Zeitgebung wird durch einen transkriptionalen-translationalen-Feedbackkreis ermöglicht. Von zentraler Bedeutung sind die beiden Uhrengene *Circadian locomotor output cycles kaput (CLOCK)* und *ARNTL*. Bei *CLOCK* und *ARNTL* handelt es sich um zwei Transkriptionsfaktoren, die heterodimerisieren und folglich zur Transkription der drei *Period Gene (PER1-3)* sowie der zwei *Cryptochrome Gene (CRY1-2)* führen (Shearman et al. 2000). Dazu bindet das *CLOCK-ARNTL*-Heterodimer an sogenannte E-box Enhancer in den Promotorregionen der Gene und aktiviert diese somit (Reppert & Weaver 2002). Alternativ kann *ARNTL* mit dem *Neuronal PAS Domain Containing Protein 2 (NPAS2)* dimerisieren (Debruyne et al. 2007). Morgens liegt nur eine kleine Menge an *PER*- und *CRY*-Proteine im SCN vor. Im Laufe des Tages steigt die Menge an, bis sie nach etwa 12 Stunden – in der frühen Nacht – ihr Maximum erreicht (Charrier et al. 2017). Wenn die Konzentration an *PER*- und *CRY*-Proteinen ausreichend hoch ist, bilden diese Heterodimere. Zusätzlich findet eine Phosphorylierung durch Casein-Kinase-1 $\delta$ , Casein-Kinase-1 $\epsilon$  und GSK-3 $\beta$  statt. Die *PER-CRY*-Casein-Kinase-1 $\delta$ / Casein-Kinase-1 $\epsilon$ -Heterodimere wandern in den Nucleus der Zelle, wo sie das *CLOCK-ARNTL*-Heterodimer inhibieren. Durch Inhibition der Transkriptionstätigkeit des *CLOCK-ARNTL*-Heterodimers inhibieren sie ihre eigene Produktion, wodurch die Menge an *CRY*- und *PER*-Proteinen in der Nacht sinkt. Die Phosphorylierung spielt vermutlich für die Repressoraktivität eine Rolle und beschleunigt den Abbau von *PER*. Dies ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Zyklus. Solange *PER* und *CRY* das *CLOCK-ARNTL*-Heterodimer inhibieren, kann kein erneuter Zyklus starten (Etchegaray et al. 2009; McClung 2007a). *PER1* und im geringeren Maße auch

*PER2* werden durch Licht aktiviert. *PER3* hingegen ist nicht lichtsensitiv und spielt vermutlich für uhrenkontrollierte Gene (CCG, engl. „Clock-controlled Genes“) eine Rolle (Travnickova-Bendova et al. 2002). *CRY* weist eine höhere Repressionswirkung auf als *PER* (Langmesser et al. 2008; Bunker et al. 2000). Die Aktivität des *CLOCK-ARNTL*-Heterodimers steigt folglich während der Nacht, da die Menge der inhibierenden *CRY*- und *PER*-Proteine immer geringer wird. In der Früh wird durch den *CLOCK-ARNTL*-Komplex erneut eine Transkription der *PER*- und *CRY*-Gene eingeleitet, wodurch der Kreislauf fortgesetzt wird (Charrier et al. 2017). Neben dem oben beschriebenen negativen Feedbackkreis gibt es des Weiteren einen positiven und einen stabilisierenden Feedbackmechanismus. Der stabilisierende Feedbackkreis wird durch *Rev-erba* sowie dem RAR-related orphan receptor  $\alpha$  (ROR $\alpha$ ) gebildet. *ARNTL* verfügt über ein ROR-responsive element (RORE) in seinem Promotor. Sowohl *Rev-erba* als auch ROR $\alpha$  können an RORE binden. ROR $\alpha$  aktiviert die Transkription von *ARNTL*, wohingegen *Rev-erba* diese inhibiert. *Rev-erba* und ROR $\alpha$  konkurrieren im Zellkern um eine Bindung an RORE (Charrier et al. 2017; Zhang et al. 2015). *Rev-erba* und ROR $\alpha$  regulieren auf dieselbe Weise auch *NPAS2*. Während der Nacht sinkt die Menge an *Rev-erba*, wodurch *NPAS2* von ROR $\alpha$  schlussendlich aktiviert werden kann (Matsumura et al. 2013). Der positive Feedbackmechanismus wird durch die inhibierende Wirkung der *PER*- und *CRY*-Proteine auf *ARNTL* initiiert. Die verminderte *ARNTL*-Transkription führt zu einer Inhibierung von *Rev-erba* und somit zu einer Deinhibierung von *ARNTL*, das normalerweise von *Rev-erba* negativ reguliert wird (Becker-Weimann et al. 2004). In anderen Studien wird von der selbst-limitierenden Wirkung *ARNTL*'s berichtet, da es *Rev-erba* aktiviert. (Jolley et al. 2014).

Durch die Bindung des *CLOCK-ARNTL*-Heterodimers an die Promotorregionen der CCG können diese aktiviert werden (Lowrey & Takahashi 2004).



*Abbildung 1-1 Schematisierter Aufbau der molekularen Uhr:* ARNTL bildet mit CLOCK oder NPAS2 ein Heterodimer und führt zur Transkription von PER und CRY. Die PER- und CRY-Proteinmenge steigt durch Lichteinwirkung an, wodurch ihre Anzahl tagsüber ansteigt und in der frühen Nacht ihr Maximum erreicht. PER und CRY bilden Heterodimere, werden durch Casein-Kinasen sowie GSK-3 $\beta$  phosphoryliert und inhibieren ARNTL/CLOCK/NPAS2 sowie ihre eigene Produktion. Durch diese Selbstlimitierung und die fehlende Lichtexposition in der Nacht sinkt die Menge an inhibierenden PER- und CRY-Proteinen wodurch die Aktivität von ARNTL/CLOCK/NPAS2 während der Nacht steigt. Morgens aktiviert die große Menge an ARNTL/CLOCK/NPAS2 erneut die Transkription von PER und CRY. Auf diese Weise beginnt der Kreislauf erneut und führt zur rhythmischen Expression von CCG. Neben diesem Regulationsweg gibt es einen weiteren Feedbackmechanismus – den stabilisierenden Feedbackkreis. ROR $\alpha$  aktiviert die Transkription von ARNTL und NPAS2, wohingegen Rev-erba diese inhibiert (eigene Darstellung).

### 1.2.1 Uhrengene und die bipolare Erkrankung

*„Unter allen psychiatrischen Erkrankungen gibt es für die BD die meisten Belege für vorliegende genetische Veränderungen der Uhrengene“ - (Lamont et al. 2010)*

Psychisch erkrankte Menschen leiden zu einem hohen Anteil an Ein- und Durchschlafstörungen. Bei der BD kommt es gehäuft zu einem unregelmäßigen Tagesrhythmus mit Schlafstörungen in der Nacht und eventuellem daraus resultierendem Müdigkeitsgefühl am Tag. Im Rahmen einer manischen Phase ist in den meisten Fällen das Schlafbedürfnis stark reduziert oder sogar aufgehoben (Charrier et al. 2017). Schlafstörungen stellen auch das häufigste Vorzeichen einer Manie dar (Jackson et al. 2003). Der Übergang von einer (Hypo)manie in die Depression oder Euthymie findet häufig während oder nach dem Schlaf statt. Der Übergang von der Depression zur (Hypo)manie hingegen tritt häufiger während oder nach einer Wachphase auf. Eine Verkürzung des Schlafes geht regelmäßig einer Manie voran, wohingegen eine Verlängerung zu einer Depression führen kann (Lamont et al. 2010; Bamne et al. 2013). Selbst während der krankheitsfreien Intervalle kommt es bei der BD vermehrt zu Schlafstörungen (Seleem et al. 2015). Ein geregelter Schlaf-Wach-Rhythmus und soziale Zeitgeber wirken therapeutisch gegen affektive Phasen. Im Gegenzug kann ein unregelmäßiger Tagesrhythmus zum Ausbruch affektiver Phasen führen (Roybal et al. 2007). Die Depression scheint ebenfalls einer circadianen Pathogenese zu unterliegen. So steigt die Prävalenz der Depression in den Wintermonaten an. In Ländern mit langen, dunklen Winternächten ist sie ebenfalls erhöht (Roybal et al. 2007). Die circadiane Rhythmik führt zur periodischen Expression von CCG, die während einer affektiven Episode verändert sind. Es kommt dadurch zu abnormalen Melatonin-, Adrenalin- und Cortisolwerten. Die Körpertemperatur, der Blutdruck und der Puls sind ebenfalls verändert. Unter Therapie gleichen sich die genannten Abweichungen jedoch an die Normwerte an. Daraus kann geschlossen werden, dass Fehlfunktionen der molekularen Uhr an der Pathogenese der BD beteiligt sind (McClung 2007a). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass eine affektive Episode über andere Mechanismen zu einer Fehlfunktion der molekularen Uhr führt (McClung 2007c). Ein veränderter Input der molekularen Uhr, direkte Veränderungen des translationalen-transkriptionalen Feedbackkreises oder ein

veränderter Output in Form von veränderten CCG könnte hierfür verantwortlich sein (Nievergelt et al. 2006).

### **1.2.1.1 Vorstudien genetischer Veränderungen von Uhrengenen bei BD**

Heute werden genetische Analysen entweder hypothesengeleitet als Assoziationsstudien oder hypothesenfrei in modernen genomweiten Assoziationsstudien (GWAS, engl. „Genome-wide association studies“) durchgeführt. Bei jenen Studien werden Polymorphismen von Betroffenen und einer Kontrollgruppe verglichen. Meist handelt es sich hierbei um Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs, engl. „single nucleotide polymorphisms“) (Mansour et al. 2009). Mansour et al. konnten 2006 einen Zusammenhang zwischen bestimmten SNPs von *ARNTL* und der BD herstellen, führten aber keine Korrekturen für mehrfaches Testen durch und wiesen auf die Notwendigkeit einer Studie mit größerer Fallzahl hin (Mansour et al. 2006). Mansour et al. führten 2009 erneut eine Assoziationsstudie mit 21 Uhrengenen durch, bei der nach der Korrektur für mehrfaches Testen kein Zusammenhang mit BD festgestellt werden konnte, obwohl bestimmte SNPs von *ARNTL* eine signifikante Assoziation zeigten (Mansour et al. 2009). Etliche weitere Studien wiesen ebenfalls einen Zusammenhang zwischen spezifischen SNPs von *ARNTL* und BD nach, konnten aber nach der Bonferroni-Korrektur für mehrfaches Testen keine Signifikanz nachweisen (Gonzalez et al. 2015; Shi et al. 2008; Soria et al. 2010; Geoffroy et al. 2015). Nievergelt et al. konnten mithilfe einer Haplotypen-Analyse spezifische Haplotypen von *ARNTL* signifikant mit BD in Verbindung bringen (Nievergelt et al. 2006). Dmitrzak-Weglarz et al. fanden ebenfalls einen Haplotyp von *ARNTL*, der vermutlich das Risiko für die BD erhöht und einen, der protektiv wirkt (Dmitrzak-Weglarz et al. 2015).

Eine spezifische Art einer Assoziationsstudie sind GWAS (Mansour et al. 2009). Etliche GWAS-Studien fanden keinen Zusammenhang zwischen Uhrengenen und BD (Consortium 2007; Sklar et al. 2008; Scott et al. 2009; Ferreira et al. 2008). Durch eine Kombination der Daten vorhergegangener GWAS können dabei Genvarianten identifiziert werden, die in den einzelnen Studien beispielsweise durch eine zu geringe Fallzahl keine Signifikanz erreichten (Le-Niculescu et al.

2008). McCarthy et al. führten eine quantitative bioinformatische Studie durch, die auf den Daten vorhergegangener, online zugänglicher GWAS basiert. Bei 50% der untersuchten Uhrgene konnte eine Assoziation mit mindestens einer psychiatrischen Erkrankung hergestellt werden. Unter diesen 50% war auch *ARNTL*, bei dem eine signifikante Assoziation mit BD ersichtlich war (McCarthy et al. 2012). Le-Niculescu et al. führten ebenfalls eine kombinierte Analyse der Daten mehrerer GWAS durch. Dabei wurde *ARNTL* gemeinsam mit drei weiteren Genen ein Platz an der Spitze der Liste der potenziellen Kandidatengene, die das Risiko an BD zu erkranken erhöhen, zugesprochen (Le-Niculescu et al. 2008).

Yang et al. führten eine quantitative Analyse der Uhrgene an Fibroblasten mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR, engl. quantitative polymerase chain reaction) durch. Es ergab sich ein Trend für eine verminderte *ARNTL*-Boten-Ribonukleinsäureexpression (mRNA, engl. „messenger ribonucleic acid“) mit einem *p*-Wert von 0.068 (Yang et al. 2009). Nakatani et al. fanden eine signifikant erhöhte *ARNTL*-Expression in post mortem entnommenen Gehirnproben von Bipolar-I-Erkrankten (Nakatani et al. 2006).

Neben *ARNTL* sind eine Reihe weiterer Uhrgene bei BD verändert. Mutationen des *CLOCK*-Gens beispielsweise führen zu einem verlängerten Schlaf-Wach-Rhythmus (Charrier et al. 2017). Genetisch veränderte Mäuse mit einer Mutation im *CLOCK*-Gen zeigen ein manieartiges Verhalten, das durch Lithiumgabe normalisiert werden kann (Roybal et al. 2007). Des Weiteren fand Johansson et al. (2003) einen Zusammenhang zwischen bestimmten *CLOCK*-Polymorphismen und der saisonal affektiven Störung, auch als „Winterdepression“ bekannt. Außerdem zeigte sich eine erhöhte Prävalenz für den nachtaktiven Typus, der ein erhöhtes Risiko für psychiatrische Erkrankungen aufweist (Johansson et al. 2003; Lamont et al. 2007). Ein bestimmter Polymorphismus am C-Allel von *CLOCK* ist zudem mit einem erhöhten Auftreten affektiver Episoden verbunden (Benedetti et al. 2003).

Mutationen von *PER2* führen zum „familial advanced sleep phase syndrome“ (familiäres verfrühtes Schlafphasensyndrom), bei dem Betroffene dem eigentlichen Rhythmus voraus sind und bereits um 7:30 abends einschlafen. Sie erwachen dafür bereits um etwa 4:30 morgens und verpassen auf diese Weise einen wichtigen Teil der sozialen Zeit ihrer Mitmenschen (Toh et al. 2001).

Mutationen von *PER3* hingegen sind mit dem „delayed sleep phase syndrome“ (verspätetes Schlafphasensyndrom) verbunden (Pereira et al. 2005).

Diese Ergebnisse deuten auf eine circadiane Pathogenese der BD hin. Vor allem ein Untertyp der BD, bei dem es zu einem raschen Wechsel der Phasen kommt (Rapid Cycling) scheint durch eine Fehlfunktion der inneren molekularen Uhr bedingt zu sein (Bamne et al. 2013).

### **1.3 MAO-A und die bipolare Erkrankung**

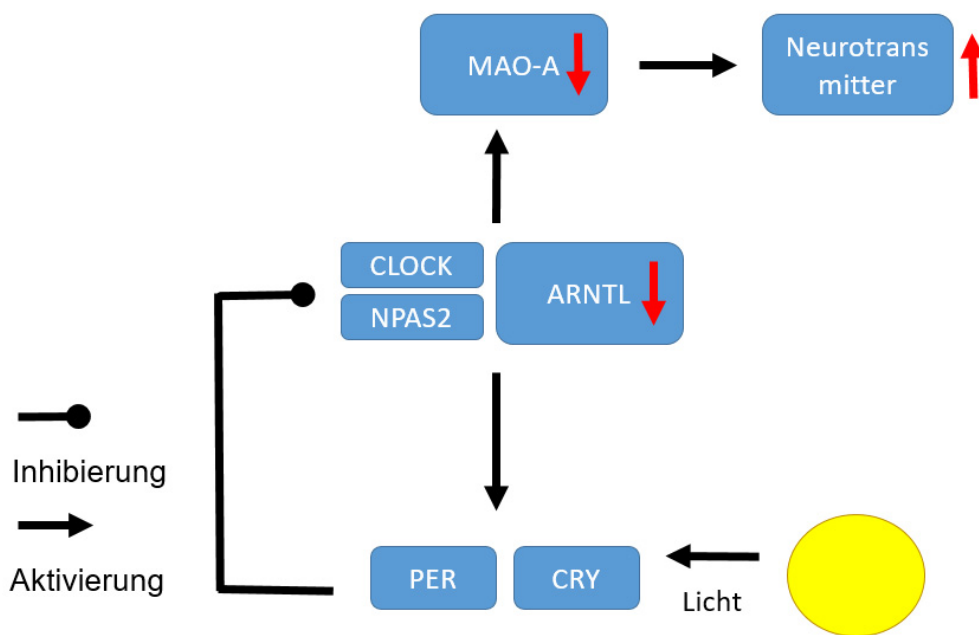
*MAO-A* und die *Monoaminoxidase B (MAO-B)* sind Enzyme, die monoamine Neurotransmitter oxidativ deaminieren und somit abbauen. Serotonin, Noradrenalin und Adrenalin werden bevorzugt von *MAO-A* abgebaut. Dopamin wird sowohl von *MAO-A* als auch *MAO-B* abgebaut (Shih et al. 2011). *MAO-Hemmer* werden auch in der medikamentösen Behandlung von depressiven Erkrankungen eingesetzt. Der Abbau der oben genannten Neurotransmitter wird hierbei gehemmt. *MAO-Hemmer* wirken antidepressiv und antriebssteigernd (Dellas 2011; Lin et al. 2008). Da vermutlich eine Balancestörung verschiedener Neurotransmitter an der Entstehung der BD beteiligt ist, wie im Abschnitt 1.1.3. „Ätiologie“ unter dem Punkt 1.1.3.2. „Neurobiologische Faktoren“ näher beschrieben, ist es sinnvoll, Gene, die diese Neurotransmitter metabolisch oder kinetisch beeinflussen, zu untersuchen (Lin et al. 2008). Dies wurde in Studien an Mäusen bereits durchgeführt. *MAO-A-Knockout-Mäuse*, bei denen das *MAO-A*-Gen deaktiviert ist, zeigten Verhaltensveränderungen im Sinne einer erhöhten Aggressivität. Daraus kann geschlossen werden, dass *MAO-A* einen Einfluss auf das Verhalten haben kann (Scott et al. 2008; Cases et al. 1995). Etliche Studien konnten zudem einen Zusammenhang zwischen genetischen Veränderungen von *MAO-A* und BD (Kawada et al. 1995; Preisig et al. 2000; Reza et al. 2015; Rubinsztein et al. 1996) feststellen, es gab allerdings auch viele Ergebnisse, die auf keine Korrelation schließen lassen (Nöthen et al. 1995; Turecki et al. 1999; Craddock et al. 1995; Huang et al. 2008). Die Uneinigkeit der Studienergebnisse kann möglicherweise auf die multifaktorielle Genese der BD zurückgeführt werden. Eine Kombination aus vielen unterschiedlichen prädisponierenden Genen kann zum Ausbruch der Erkrankung führen. Dazu kommt noch, dass Umwelteinflüsse in Form von epigenetischen Veränderungen auch Einfluss auf die Pathogenese nehmen können (Lin et al. 2008). Weitere Studien sind nötig um die Bedeutung von *MAO-A* bei der Entstehung der BD zu verstehen.

Besonders relevant für die vorliegende Studie ist, dass *MAO-A* und damit auch der Neurotransmitterabbau dem circadianen Rhythmus unterliegt. Das *ARNTL-NPAS2*-Heterodimer kann die Transkription von *MAO-A* initiieren, was zu einem vermehrten Abbau von Dopamin führt und folglich einer Manie entgegenwirkt (Kripke et al. 2009). Hampp et al. beschreiben des Weiteren eine Bindung des

*CLOCK-ARNTL*-Heterodimers an *MAO-A*, sowie eine positive regulatorische Eigenschaft von *PER2*. Ein Fehlen von *PER2* führt zu einer geringeren *MAO-A*-Expression, was zu einem Überangebot an Dopamin und damit verbundenen Verhaltensänderungen führt (Hampp et al. 2008).

*MAO-B*-Inhibitoren sind wirksam gegen ER-stressinduzierten Zelltod (Sanz et al. 2009). ER-Stress führt über eine gestörte  $Ca^{2+}$ -Homöostase zur erhöhten *MAO-A*-Aktivität, durch welche vermehrt Reaktive Sauerstoffspezies (ROS, engl. „reactive oxygen species“) anfallen. Ein Nebenprodukt von *MAO-A* ist Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), das zu den ROS zählt (Lee et al. 2013).

In der folgenden Darstellung ist die vermutlich veränderte *MAO-A*-Expression bei BD und ihre Auswirkungen schematisiert dargestellt:



**Abbildung 1-2 Schematisierter Aufbau der molekularen Uhr und ihrer Auswirkungen auf MAO-A:** Bei BD kommt es durch eine verringerte *ARNTL*-Expression in Folge zu einer geringeren *MAO-A*-Expression, was sich an einem Anstieg der Neurotransmitter (Dopamin, Serotonin, Noradrenalin, Adrenalin) bemerkbar macht. Ein Anstieg der Neurotransmitter kann zu einer Manie führen (eigene Darstellung).

## 1.4 ER-Stress

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein Netzwerk aus schlauchartigen Membrantubuli und abgeplatteten Zisternen, das in allen eukaryotischen Zellen das Zytoplasma durchzieht (Zhang & Kaufman 2008; Campbell & Reece 2009). Der Name „Endoplasmatisches Retikulum“ leitet sich von den Wörtern „endos“ (innerhalb) und „reticulum“ (kleines Netz) ab (Horn 2009). Es erstreckt sich von der Zellmembran der Zelle bis zum Zellkern und macht in vielen eukaryotischen Zellen mehr als die Hälfte der Membranoberfläche aus. Elektronenmikroskopisch kann das ER in einen ribosomenbesetzten und aus diesem Grund rau erscheinenden Bereich und einen glatten Bereich unterteilt werden (Campbell & Reece 2009). Im glatten ER findet die Synthese von Lipiden, ein Teil der Glukoneogenese, die Herstellung von Bilirubin sowie eine Detoxifizierung von Giften und Medikamenten statt. Des Weiteren werden Steroidhormone im glatten ER produziert, wodurch Organe mit vermehrter Steroidproduktion, wie die Nebennierenrinde und der Hoden, einen hohen glatten ER-Anteil aufweisen. Leberzellen besitzen durch ihre Entgiftungsfunktion auch vermehrt glattes ER. Bei Alkoholikern oder durch Barbituratmissbrauch kommt es kompensatorisch zu einer Vermehrung des glatten ER. Aufgrund der dadurch erhöhten Entgiftungsfunktion wird erst bei einer höheren Dosis der Effekt der Drogen wahrgenommen (Campbell & Reece 2009; Horn 2009). Das glatte ER ist außerdem der größte Calciumspeicher der Zelle (Sprenkle et al. 2017). An den Ribosomen des rauen ERs findet die Proteinbiosynthese statt (Horn 2009). Die meisten sekretorischen Proteine, aber auch Membranproteine und Lysosomen werden im rauen ER gebildet (Horn 2009; Campbell & Reece 2009). Durch eine N-terminale Signalfrequenz findet die Translation der auf diese Weise markierten mRNA der sekretorischen Proteine an den Ribosomen des ERs statt und nicht an den freien Ribosomen im Zytosol (Sprenkle et al. 2017). Ein Teil der neu synthetisierten Proteine wird schlussendlich im Lumen des ER durch Faltungen und posttranslationale Modifizierungen fertiggestellt (Lodish et al. 2000). Die Funktion der Proteine wird ausschlaggebend durch ihre dreidimensionale Faltung bedingt (Díaz-Villanueva et al. 2015). Aufgrund krankheitsbedingter mutierter Proteine, viraler Infektionen, einer erhöhten Sekretion in endokrinen und exokrinen Zellen, ROS, Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homoöstase oder Hypoxie kommt es vermehrt zu

fehlgefalteten Proteinen (Bengesser, Fuchs, et al. 2016; Dufey et al. 2014). Selbst im gesunden Organismus werden bis zu 30% der neusynthetisierten Proteine wieder abgebaut, zumeist aufgrund einer inkorrekten Faltung (Glembotski 2007). Eine Anstauung von fehlgefalteten oder ungefalteten Proteinen im ER behindert dessen Funktionen und führt zu ER-Stress. In Folge wird eine Reihe an Copingmechanismen aktiviert. Einen essentiellen Teil dieser Copingmechanismen bildet die Unfolded Protein Response (UPR, dt. ungefaltete Protein Reaktion). Die UPR wird durch drei Proteine gebildet, die eine Signalkaskade zur Beseitigung des ER-Stresses aktivieren (Sprenkle et al. 2017).

1. *double stranded RNA dependent protein kinase like ER kinase (PERK)*
2. *Inositol-Requiring Protein 1 Alpha (IRE1a)*
3. *Activating transcription factor 6 (ATF6)*

Im stressfreien Zustand sind die Proteine der UPR an ihrer luminalen Seite an das ER-stressassoziierte Protein *BiP* gebunden und liegen somit inaktiv vor. *BiP* ist ein Chaperon, das ausschlaggebend an der Faltung von Proteinen beteiligt ist (Malhotra & Kaufman 2007). Unter ER-Stress löst sich *BiP* von *PERK*, *IRE1a* sowie *ATF6* ab und wandert zu den angesammelten, funktionsunfähigen Proteinen, wo es bei deren Faltung assistiert. Die UPR wird durch diese Dissoziation von *BiP* initiiert (Glembotski 2007).

1. *PERK* ist ein ER-Transmembranprotein und liegt im stressfreien Zustand als Monomer gebunden an *BiP* vor. Dies entspricht dem inaktiven Zustand von *PERK*. Bei einem Anstieg der fehlgefalteten Proteine löst sich *BiP* von *PERK* ab und assistiert als Chaperon bei deren Faltung. Durch die Abspaltung von *BiP* kann *PERK* nun dimerisieren und autophosphoryliert sich ebenfalls. Das auf diese Weise aktivierte *PERK*-Protein phosphoryliert den *eukaryotic Initiation Factor of Translation (eIF2 $\alpha$ )* (Glembotski 2007). Phosphoryliertes *eIF2 $\alpha$*  unterdrückt den Zusammenbau von eukaryotischen 80s-Ribosomen und in Folge die Translation. Auf diese Weise wird einer Anstauung von fehlgefalteten Proteinen im ER entgegengewirkt (Saito et al. 2011). Des Weiteren führt *eIF2 $\alpha$*  zu einer vermehrten Expression von *Activating transcription factor 4 (ATF4)*, einem

Transkriptionsfaktor, der zur Aktivierung und Herstellung UPR-spezifischer, protektiver Proteine führt. Durch *ATF4* werden beispielsweise Gene aktiviert, die an der Proteinfaltung sowie an der Aminosäuresynthese beteiligt sind und deren Transport, aber auch die Aktivierung von Antioxidantien initiiert. Auf diese Weise wird die Zellhomöostase erhalten. *ATF4* reguliert außerdem die Expression von *CHOP* (Sprenkle et al. 2017).

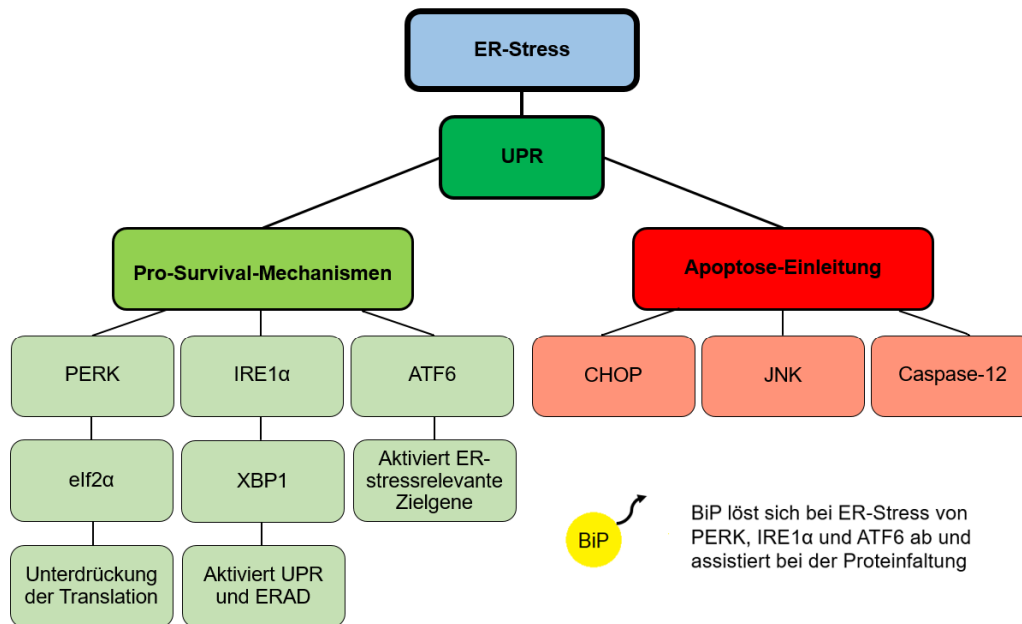
2. Durch die Abspaltung von *BiP* von dem Transmembranprotein *ATF6* kommt es zu dessen Translokation zum Golgi-Apparat, wo es durch zwei Proteasen aktiviert wird (Sprenkle et al. 2017; Glembotski 2007). Die aktivierte Form von *ATF6* wandert folglich zum Nucleus und initiiert dort die Expression verschiedener ER-stressrelevanter Gene, wie *BiP*, *CHOP*, *X-box binding protein 1 (XBP1)* und *cAMP response element-binding protein (CREB)* (Sano & Reed 2013; Tabas & Ron 2011; Kakiuchi et al. 2005).
3. IRE1 $\alpha$  wird neben der Dissoziation von *BiP* auch durch direkte Bindung von ungefalteten Proteinen aktiviert (Sano & Reed 2013; Tabas & Ron 2011). In Folge führt IRE1 $\alpha$  durch dessen Ribonuklease (RNase) Aktivität zum Splicing von *XBP1*, das wiederum eine Menge an UPR- und ER-assoziiierter-Proteindegradierung (ERAD, engl. ER associated protein degradation) -spezifischen Genen kontrolliert (Hetz & Glimcher 2009; Li et al. 2014).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die auf das Überleben der Zelle gerichtete UPR-Antwort drei Wege verfolgt (Saito et al. 2011):

1. Unterdrückung der Translation um die Anstauung von Proteinen zu minimieren
2. Herstellung optimaler Bedingungen für die Proteinfaltung und Aktivierung von Chaperonen, die bei der Faltung fehlgefalteter Proteine assistieren
3. Abbau fehlgefalteter Proteine durch den Ubiquitin-Proteasom-Pathway (ERAD)

Wenn die UPR insuffiziente Ergebnisse erzielt, wie es durch andauernden ER-Stress der Fall sein kann, kommt es zur Einleitung des kontrollierten Zelltodes (Saito et al. 2011; Glembotski 2007). Ein Weg, der zum Zelltod führt, verläuft über den Transkriptionsfaktor *CHOP*, der eine ganze Reihe an Downstreamgenen moduliert. Eines davon ist das pro-survival Protein *B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)*, das durch *CHOP* gehemmt wird. Das pro-apoptotische *B-cell lymphoma X (Bcl-X)*, das zur selben Familie gehört, wird im Gegensatz nicht unterdrückt (Li et al. 2014). Ein weiterer Mechanismus über den *CHOP* in den Zelltod führt, ist der oxidative Stress. In einem physiologischen Umfeld führt die *ER-Oxidase 1α (ERO1α)* zur Bildung von Disulfidbrücken der neu synthetisierten Proteine. Unter prolongiertem ER-Stress hingegen wird durch *ERO1α* vermehrt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im ER gebildet, das schlussendlich ins Zytosol gelangt, wo es zur Bildung von ROS führt und den Zelltod begünstigt (Tabas & Ron 2011). Aktiviertes, phosphoryliertes *eIF2α* verlangsamt die Translation und verhindert somit eine Anstauung ungefalteter Proteine. *Growth arrest and DNA damage-inducible protein 34 (GADD34)*, welches durch *CHOP* aktiviert wird, dephosphoryliert *eIF2α*, wodurch es zu einer Anstauung fehlgefalteter Proteine und schlussendlich zur Apoptose kommt (Tabas & Ron 2011). Han et al. konnten ebenfalls einen Anstieg der Proteinsynthese durch *CHOP* und *ATF4* nachweisen, welche in weiterer Folge zu einer Überproduktion fehlgefalteter Proteine führt (Han et al. 2013). Des Weiteren führt *CHOP* über Downstream von *CHOP 1 (DOC1)*, *DOC4* und *DOC6* zum programmierten Zelltod. *DOC1* führt zu einem Anstieg der Protonenkonzentration und einem Abfall des pH-Wertes. *DOC6* führt zu einem Abbau des Aktinzytoskeletts. *DOC4* übernimmt vermutlich eine Signalfunktion zwischen verschiedenen Bereichen der Zelle (Li et al. 2014). Außerdem kommt es zu einem Anstieg an *BCL2 associated X (BAX)* und *Tribbles-related protein 3 (TRB3)* durch *CHOP* (Li et al. 2014).

Neben *CHOP* können der c-Jun N-terminal kinase Pathway (*JNK*-Pathway) und die ER-ständige Caspase-12 eine Apoptose initiieren (Nakagawa et al. 2000; Rasool et al. 2017).



*Abbildung 1-3 ER-Stressreaktion:* Durch eine Anstauung fehlgefalteter Proteine kommt es zum ER-Stress. *BiP* löst sich von *PERK*, *IRE1α* und *ATF6* um bei der Proteinfaltung zu assistieren. *PERK*, *IRE1α* und *ATF6* werden durch die Abspaltung von *BiP* aktiviert und leiten ihrerseits Prozesse zur Bewältigung des ER-Stress ein. Kann die Zelle den ER-Stress nicht beseitigen, wird eine Apoptose eingeleitet. Dies geschieht unter anderem durch den in dieser Studie untersuchten Parameter *CHOP* (eigene Darstellung).

### 1.4.1 ER-Stress und die bipolare Erkrankung

Viele Wege der multimodalen Entstehung der BD sind noch nicht erforscht. Einen Hinweis auf den Zusammenhang zwischen BD und ER-Stress lieferte das Malariamedikament Mefloquin, das bei vulnerablen PatientInnen manische Symptome und ER-Stress als Nebenwirkung verursachen kann (Dow et al. 2005; Pfaffenseller et al. 2014). Auch die Droge Metamphetamin führt zu einem manisch-psychotischen Zustand und zugleich zu einem Anstieg der ER-stressassoziierten Proteine *BiP* und *CHOP* (Kakiuchi et al. 2005; Jayanthi et al. 2004). Dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen BD und ER-Stress hin, beantwortet aber nicht die Frage nach Ursache und Folge.

Ein weiterer Anhaltspunkt für einen Zusammenhang von ER-Stress und BD ist Darier's Disease, bei der eine Mutation in dem Gen vorliegt, das die sarkoplasmatische/endoplasmatisches-Retikulum-Ca<sup>2+</sup>-ATPase 2 (*SERCA2*) kodiert. Neben dermatologischen Symptomen liegt bei dieser Erkrankung ein erhöhtes Risiko an BD zu erkranken vor (Jacobsen et al. 1999).

Phasenprophylaktika, die für die medikamentöse Therapie der BD in Verwendung sind, üben eine Wirkung auf ER-stressrelevante Gene aus. Kakiuchi et al. und Chen et al. wiesen einen positiv regulatorischen Effekt von Valproat auf *GRP94* nach, einem Protein, das an der Proteinfaltung und Degradierung beteiligt ist. Das Medikament Valproat, das bei BD zum Einsatz kommt, wirkt sich somit positiv auf Prozesse aus, die dem ER-Stress entgegenwirken (Kakiuchi et al. 2009; Chen et al. 2000). Chen et al. und Bown et al. konnten außerdem eine Hochregulation von *BiP* durch Valproat nachweisen (Chen et al. 2000; Bown et al. 2002). *CHOP* hingegen wird durch Valproat unterdrückt (Li et al. 2017). Shao et al. konnten zudem einen Anstieg der Chaperone *BiP* und *GRP94* durch Lithium nachweisen (Shao et al. 2005). An dieser Stelle stellt sich die Frage, ob sie gerade wegen ihrer Wirkung auf ER-stressrelevante Proteine eine wirkungsvolle Therapie bei BD darstellen oder ob andere Mechanismen im Vordergrund stehen. Da es sich bei der Entstehung der BD allen Annahmen nach um eine multifaktorielle Genese handelt, ist es wichtig, jeden Weg, der zur Pathogenese beiträgt zu erforschen, um BD schlussendlich auch ganzheitlich therapieren zu können.

Eine der aktuellsten Studien, die ER-stressassoziierte Proteine und/oder Gene im peripheren Blut von PatientInnen misst, ist von Pfaffenseller et al. erstellt worden

und widmet sich dem Zusammenhang zwischen BD und ER-Stress auf Proteinebene. Pfaffenseller et al. versetzten Lymphozyten in vitro durch Tunicamycin in ein Zellstressstadium und stellten die UPR-assoziierten Proteine *BiP*, *phosphoryliertes eIF2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ -P)* und *CHOP* von BD-PatientInnen und einer Kontrollgruppe gegenüber. Tunicamycin unterband die Glykosylierung neu synthetisierter Proteine und führte somit zu einer Anstauung dieser im ER, an dem Ort, an dem die Glykosylierung eigentlich stattfinden sollte. In der Kontrollgruppe war eine adäquate UPR-Antwort zu erkennen: Anfänglich kam es zu einem Anstieg an *BiP* und *eIF2 $\alpha$ -P*, nach prolongiertem Zellstress zu einem Anstieg an *CHOP*. In der BD-Gruppe hingegen konnte kein signifikanter Anstieg von *BiP* sowie *eIF2 $\alpha$ -P* nachgewiesen werden. Dies lässt auf eine gestörte UPR-Antwort bei BD schließen, oder zumindest auf eine gestörte Antwort des *PERK*-Pathways. Des Weiteren war in der BD-Gruppe kein Anstieg an *CHOP* zu erkennen. Trotzdem kam es zu einem vermehrten Zellsterben gegenüber der Kontrollgruppe. Dies kann durch die Existenz zusätzlicher Mechanismen der Apoptoseeinleitung neben *CHOP* erklärt werden. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen euthymen und affektiven Phasen der Erkrankung gefunden werden. Dies konnte aber möglicherweise an der geringen Anzahl an PatientInnen in affektiven Phasen, die in die Studie eingeschlossen wurden, liegen (euthym = 20, depressiv = 6, hypomanisch = 4) (Pfaffenseller et al. 2014). In einer anderen Studie wurden B-Lymphoblasten durch Tunicamycin und Thapsigargin (SERCA-Inhibitor) von Bipolar-I-PatientInnen sowie einer gesunden Kontrollgruppe in ein ER-Stress-Stadium versetzt (So et al. 2007). In der Gruppe der Bipolar-I-Erkrankten blieb ein adäquater Anstieg an *CHOP*- und *XBP1*-mRNA aus, der aber in der Kontrollgruppe deutlich zu beobachten war. Für *BiP* konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachgewiesen werden (So et al. 2007). Hayashi et al. verwendeten dieselben ER-Stressoren wie So et al., konnten aber keinen signifikanten Unterschied zwischen der BD-Gruppe und der Kontrollgruppe bezüglich der *BiP*- und *CHOP*-Expression in lymphoblastoiden Zellen mittels reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR, engl. "real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction") nachweisen. *XBP1*- und *GRP94*-mRNA waren unter Thapsigargin-Gabe in der BD-Gruppe signifikant verringert (Hayashi et al. 2009). Kakiuchi et al. untersuchten ebenfalls die Auswirkungen von Thapsigargin auf *BiP* sowie *XBP1* und beobachtete einen

geringeren Anstieg der beiden Proteine in der BD-Gruppe. Gearbeitet wurde mit lymphoblastoiden Zellen von Zwillingen. Valproat unterstützte die UPR-Mechanismen, indem es zur Erhöhung der *ATF6*-Menge führte. Im Gegensatz zu anderen Studien kam es dabei nicht zu einer Induktion von *BiP*, was aber an der verwendeten Konzentration an Valproat liegen kann. Kakiuchi et al. konnten einen Polymorphismus in der Promotorregion von *XBP1* ausmachen, der zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für BD führt (-116C→G) (Kakiuchi et al. 2003). Bengesser et al. untersuchten die basale Expression von *BiP* und *CHOP* ohne medikamentös induzierten ER-Stress. In der BD-Gruppe war eine signifikante Erhöhung der *BiP*-Expression vorhanden (Bengesser et al., 2016). Die Expression von *CHOP* unterschied sich nicht signifikant zwischen der BD- und Kontrollgruppe (Bengesser 2016).

*Table 1-4* **Übersichtsdarstellung der Studien bezüglich der *CHOP*- und *BiP*-Expression im peripheren Blut nach ER-Stressinduktion.** Unterschiede zwischen den Studien können auf eine unterschiedliche PatientInnenpopulation sowie unterschiedliche Kulturbedingungen zurückgeführt werden (Hayashi et al. 2009; Pfaffenseller et al. 2014).

Studie	<i>CHOP</i> bei BD	<i>BiP</i> bei BD
<b>Pfaffenseller et al. 2014</b>	verringert	verringert
<b>So et al. 2007</b>	verringert	Kein sign. Unterschied
<b>Hayashi et al. 2009</b>	Kein sign. Unterschied	Kein sign. Unterschied
<b>Kakiuchi et al. 2003</b>	Nicht untersucht	verringert

*Table 1-5* **Übersichtsdarstellung der Studien bezüglich der Genexpression von *CHOP* und *BiP* im peripheren Blut ohne ER-Stressinduktion**

Studie	<i>CHOP</i> bei BD	<i>BiP</i> bei BD
<b>Bengesser et al. 2016</b>	Kein sign. Unterschied	erhöht

Die vorliegende Studie setzt an den in den Tabellen 1-4 und 1-5 genannten Studien an und untersucht einen Zusammenhang zwischen ER-Stress und BD auf Transkriptionsebene ohne ER-Stressinduktion.

## **1.5 Hypothesen und Ziele der Studie**

Die übergestellten Fragestellungen dieser Studie lauten:

1. Unterscheiden sich BD-PatientInnen signifikant von gesunden Kontrollen in den untersuchten Genexpressionsmarkern (*ARNTL*, *MAO-A*, *BiP*, *CHOP*)?
2. Gibt es eine Korrelation zwischen ER-Stress, *ARNTL* und *MAO-A*?

Spezifisch wurden folgenden Hypothesen aufgestellt:

1. *Bei BD kommt es zu einer signifikant erniedrigten Expression von ARNTL und MAO-A im Vergleich zu gesunden Kontrollen.*
  - a. *In affektiven Phasen der BD kommt es zu einer signifikant erniedrigten Expression von ARNTL und MAO-A im Vergleich zur euthymen Phase.*
2. *Bei BD kommt es zu einer signifikant erhöhten Expression von BiP im Vergleich zu gesunden Kontrollen.*
  - a. *In affektiven Phasen der BD kommt es zu einer signifikant erhöhten Expression von BiP im Vergleich zur euthymen Phase.*
3. *Bei BD kommt es zu einer signifikant erniedrigten Expression von CHOP im Vergleich zu gesunden Kontrollen.*
  - a. *In affektiven Phasen der BD kommt es zu einer signifikant erhöhten Expression von CHOP im Vergleich zur euthymen Phase.*
4. *ER-Stressmarker korrelieren mit der Genexpression von ARNTL und MAO-A.*

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Studiendesign**

Die Datenerhebung der vorliegenden Kohortenstudie erfolgte im Rahmen der „BIPFAT“ (EK Nr. 24-123 ex 11/12) und „BIPGEN“-Studien (EK Nr. 23-199 ex 10/11) an der Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapeutische Medizin der Medizinischen Universität Graz, Österreich. Die BIPGEN-Studie beschäftigt sich mit genetischen Grundlagen, die eine Rolle für den Pathomechanismus der BD spielen. Die BIPFAT-Studie versucht einen Zusammenhang zwischen dem Pathomechanismus der BD und metabolischen Prozessen zu finden. Beide Studien weisen gemeinsame Teilgebiete auf. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz, Österreich, freigegeben. Vor der Rekrutierung wurden die Ausschlusskriterien definiert. Schwere medizinische Erkrankungen wie die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD, engl. „Chronic obstructive pulmonary disease“), der systemische Lupus erythematodes, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, aktive Krebserkrankungen, neurokognitive und neurodegenerative Erkrankungen sowie laufende Therapien wie beispielsweise eine Hämodialyse oder Interferon- $\alpha$ -Immuntherapie führten zum Ausschluss aus der Studie. Alle StudienteilnehmerInnen wurden über den Ablauf der Studie sowie deren Risiken und Vorteile vor Teilnahme an der Studie ausführlich aufgeklärt und haben vor dem Einschluss in die Studie eine Einverständniserklärung unterschrieben. Alle StudienteilnehmerInnen waren volljährig.

Die BD-Kohorte umfasst 84 TeilnehmerInnen. Diese wurden sowohl ambulant als auch stationär über die Spezialambulanz für BD der Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapeutische Medizin der Medizinischen Universität Graz rekrutiert. Die Diagnose wurde durch ein ärztliches Gespräch anhand des strukturierten klinischen Interviews für DSM-IV (SCID-I, engl. „Structural Clinical Interview“) verifiziert. Der Schweregrad der aktuellen affektiven Symptomatik der PatientInnen wurde mithilfe der Hamilton Rating Scale for Depression (HAM-D) und der Young Mania Rating Scale (YMRS) bestimmt. Schwerwiegender Substanzmissbrauch führte zum Ausschluss aus der BD-Kohorte.

Die Kontrollgruppe wurde aus der Allgemeinbevölkerung rekrutiert, umfasst 54 TeilnehmerInnen und wird in Kapitel 3.1. „Kohortenbeschreibung“ deskriptiv näher beschrieben. Stattgefundene oder gegenwärtige psychiatrische Erkrankungen, Verwandtschaft ersten Grades zu Personen mit psychiatrischer Diagnose sowie an schweren Erkrankungen leidenden Personen wurden aus der Kontrollgruppe ausgeschlossen.

Eine standardisierte Anamnese beider Gruppen wurde von geschulten MitarbeiterInnen, PsychiaterInnen und PsychologInnen der BD-Forschungsgruppe der Medizinischen Universität Graz erhoben. Gesammelt wurden demographische, psychiatrische und medizinische Daten.

Die statistische Analyse wurde mit einem ProbandInnenkollektiv von insgesamt 138 Personen durchgeführt. Um den bisher gesammelten Datensatz zu erweitern, wurden im Rahmen dieser Diplomarbeit 31 weitere Proben im Labor analysiert.

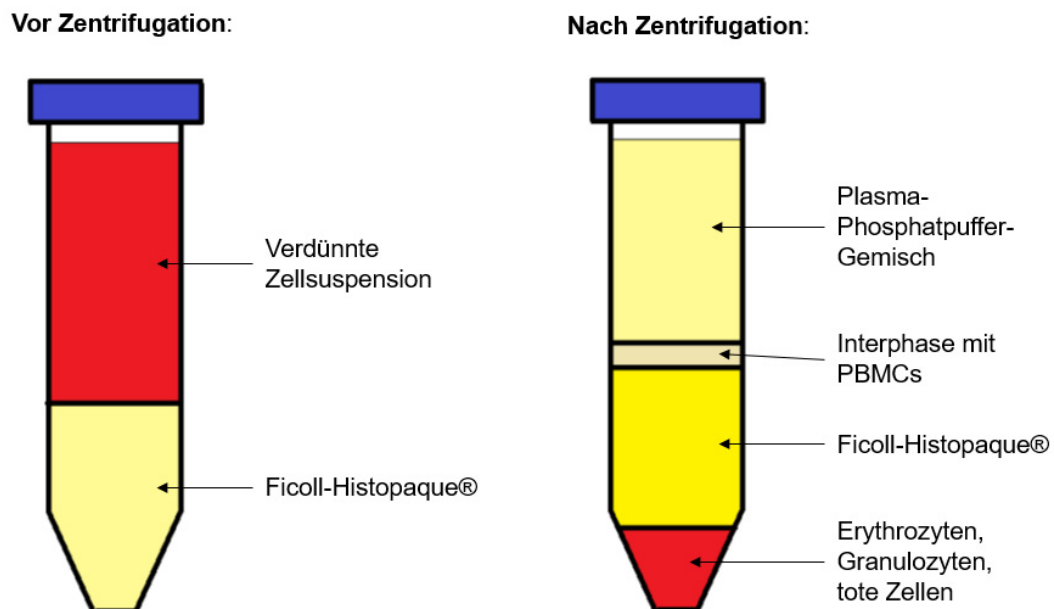
## **2.2 Workflow**

Die Blutentnahmen erfolgten an nüchternen StudienteilnehmerInnen zwischen 8:30 und 9:30 morgens. Aus dem abgenommenen Vollblut wurden die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs, engl. „peripheral blood mononuclear cells“) isoliert. Dies geschah nach dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation mittels Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Bis zur weiteren Aufbereitung wurden die isolierten PBMCs bei -20°C gelagert. Die Ribonukleinsäure (RNA, engl. „ribonucleic acid“) -Isolation erfolgte mittels TRI Reagent RT® (MRC Inc., Cincinnati, OH, USA). Die gewonnene RNA wurde anschließend mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA) in copy-Desoxyribonukleinsäure (cDNA, engl. „copy deoxyribonucleic acid“) umgewandelt. Mit der synthetisierten cDNA war es folgend möglich, eine quantitative Genexpressionsanalyse durchzuführen. Dazu wurde eine qPCR verwendet. Für *ARNTL* und *MAO-A* sowie das ribosomale Referenzgen 18s wurden die TaqMan®-Sonden als Detektionsfarbstoff für die qPCR gewählt. Für die ER-stressassoziierten Parameter *CHOP* und *BiP* sowie das Referenzgen *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1)* wurde SYBR® Green verwendet.

## 2.3 Hintergrundwissen

### 2.3.1 PBMC-Isolation mit Ficoll-Histopaque®

Die Gliederung der Blutbestandteile erfolgte aufgrund der Histopaque®-Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), die aus Polysaccharose und Natriumdiatrizoat besteht. Diese weist eine Dichte von ca. 1,077 g/ml auf und lagert sich nach dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation unter den PBMCs ab. Diese können dann vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgehoben werden.



*Abbildung 2-1* **Ficoll-Histopaque®-Dichtegradientenzentrifugation:** Als unterste Schicht lagern sich nach der Zentrifugation Erythrozyten, Granulozyten sowie abgestorbene Zellen ab. Darüber befindet sich eine Phase aus Histopaque®, das sich unter den PBMCs ablagert. Über den PBMCs bildet sich eine Schicht aus Plasma und dem Phosphatpuffer. Die Interphase mit den PBMCs kann auf diese Weise vorsichtig abgehoben werden (eigene Darstellung).

### 2.3.2 cDNA-Synthese

Die gewonnene RNA wurde in cDNA umgeschrieben. Die synthetisierte cDNA wurde für die weitere Analyse mittels qPCR benötigt. RNA-abhängige DNA-Polymerasen sind in der Lage, RNA in DNA umzuschreiben. Sie werden als reverse Transkriptasen (RT) bezeichnet und kommen in der Natur beispielsweise bei dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV), der zur Gruppe der Retroviren gehört, vor. Mit Hilfe der RT wandelt der Virus sein RNA-Genom in DNA um, welche anschließend in das Genom der infizierten Zelle eingebaut wird (Thiemann et al. 2015). Zur Markierung der gewünschten Sequenz werden Primer verwendet, die an die RNA binden und somit einen DNA/RNA-Hybrid bilden. Von diesem Startpunkt ausgehend synthetisiert die RT den komplementären DNA-Strang zur RNA-Matrize (Müller 2001). Anschließend ist eine qPCR möglich, bei der die synthetisierte cDNA durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase nun vervielfältigt werden kann.

Folgend werden die Bestandteile des Mastermixes besprochen, der für die Reaktion notwendig ist. Der genaue Ablauf ist in Kapitel 2.4.4 „cDNA-Synthese mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems/Thermo Fisher“ beschrieben.

Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) dienen als Bausteine für die Polymerase, die mit diesen den komplementären Strang bildet. Es gibt vier verschiedene dNTPs:

- Desoxyadenosintriphosphat (dATP)
- Desoxycytidintriphosphat (dCTP)
- Desoxyguanosintriphosphat (dGTP)
- Desoxythymidintriphosphat (dTTP)

Der Puffer bietet den DNA-Polymerasen das richtige Milieu um selbst bei den extremen Temperaturschwankungen einer PCR arbeiten zu können. Jede Polymerase benötigt eine andere Zusammensetzung der Pufferflüssigkeit. Diese legen den pH-Wert fest und beinhalten meist ein- oder zweiwertige Kationen.

Random-Hexamer-Primer sind unspezifische Primer, die sich sowohl an ribosomale als auch genomische DNA anlagern und als Startpunkt dienen. Durch ihre Unspezifität bedingt kommt es zu einer Umwandlung verschiedener RNA Sequenzen in DNA. Es ergeben sich verschiedenen Start- und Endpunkte und folglich ein Längenunterschied der Sequenzen. Für eine gezielte Amplifikation während der qPCR sind spezifische Primer notwendig (Thiemann et al. 2015).

### **2.3.3 qPCR**

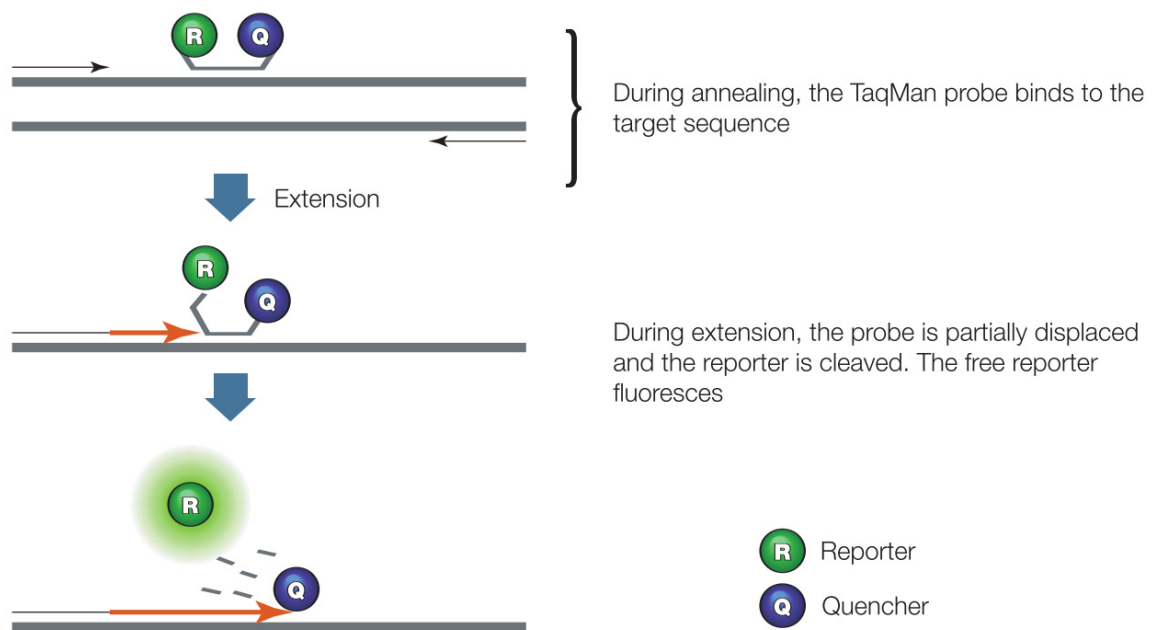
Mit Hilfe der PCR lassen sich spezifische DNA-Zielsequenzen in vitro, ohne die Beteiligung lebender Zellen, vervielfältigen (Campbell & Reece 2009). Um eine spezifische Vervielfachung zu erreichen, ist es nötig, die Nukleotidsequenz des gewünschten Abschnitts zu kennen. Zur Festlegung des Startpunktes der PCR werden, analog zur DNA-Replikation, Primer verwendet (Horn 2009). Primer sind einzelsträngige, komplementäre Sequenzen zur gewählten DNA-Sequenz, die an diese binden und als Startpunkt für die Polymerase dienen (Newton & Graham 1994). Um eine Bindung der Primer zu ermöglichen, wird in der ersten Phase der PCR, der Denaturierungsphase, die doppelsträngige cDNA durch Hitzeeinwirkung getrennt, sodass schlussendlich zwei Einzelstränge vorliegen. Die Trennung erfolgt üblicherweise bei 95°C, da hitzestabile Polymerasen diese Temperatur überstehen können (Scientific 2014). In der nächsten Phase der PCR, der Hybridisierungsphase (auch Annealingphase genannt), wird die Temperatur auf 60°C abgekühlt, sodass die Primer an die einzelsträngigen DNA-Abschnitte binden können. Diese binden meist schneller als der komplementäre DNA-Abschnitt, da sie im Überschuss vorliegen und durch ihre geringere Größe wendiger sind (Horn 2009). Bei der darauffolgenden Extensionsphase setzt die DNA-Polymerase bei 70-72°C an die Primer an und synthetisiert von diesen ausgehend die komplementären Stränge zum markierten DNA-Abschnitt (Scientific 2014). Die eben beschriebenen Schritte werden wiederholt, bis eine ausreichende Menge an DNA vervielfältigt wurde. Meist sind dazu 30 bis 40 Zyklen notwendig, wodurch der gewählte DNA-Abschnitt theoretisch etwa 230- bis 240-fach vervielfältigt wird (Horn 2009). In der Praxis wird jedoch keine hundertprozentige Ausbeute erreicht. Dies lässt sich durch die Denaturierung der

Polymerase, einem Unterangebot des Enzyms sowie der steigenden Hybridisierung der erzeugten DNA-Stränge untereinander erklären (Newton & Graham 1994). Bei der klassischen Endpoint-PCR können die PCR-Produkte erst nach Abschluss der PCR quantifiziert werden. Dazu wird meist eine Gelelektrophorese verwendet (Scientific 2014). Durch spezielle Thermocycler, die neben der Temperaturkontrolle zudem noch über ein Modul zur Detektion fluoreszierender Farbstoffe verfügen, kann die Amplikon-Menge in Echtzeit, also während der laufenden Reaktion, gemessen werden. Dies wird durch einen fluoreszierenden Farbstoff erreicht, der proportional zur Menge der cDNA ansteigt (BIO-RAD 2006). Eine Evaluierung der Amplikon-Menge zu jeder Zeit der Reaktion und ein äußerst präziser Rückschluss auf die Startmenge der Probe wird dadurch ermöglicht (Scientific 2014). Es handelt sich somit um einen quantitativen Nachweis. Qualitative Nachweise finden vor allem bei Erregernachweisen statt. Diese beantworten die Frage, ob ein Krankheitserreger nachweisbar ist, liefern aber keine genaue Mengenangaben (Bustin et al. 2009). Es gibt verschiedene Methoden, DNA mithilfe von fluoreszierenden Farbstoffen sichtbar zu machen. Für die Analyse von *ARNTL* und *MAO-A* wurde die TaqMan®-Methode angewandt, für *CHOP* und *BIP* die SYBR® Green-Methode.

### **2.3.3.1 TaqMan®-Methode**

Bei der TaqMan®-Methode entsteht ein spezifisches Fluoreszenzsignal, das nur bei einer erfolgreichen Amplifikation der Zielsequenz ausgesendet wird. Die Fluoreszenzquelle ist an ein Oligonukleotid gebunden, das komplementär zu der Zielsequenz ist und an diese bindet. Dadurch wird die Spezifität der Reaktion ermöglicht (Dale et al. 2012). Zusätzlich werden wie gewöhnlich zwei spezifische Primer verwendet um die Zielsequenz, die amplifiziert werden soll, zu markieren. Am 5'-Ende der Oligonukleotidsequenz, der sogenannten TaqMan®-Sonde, befindet sich ein fluoreszierender Farbstoff, der nach Aktivierung ein Signal abgibt. Er wird als Reporter bezeichnet. Am 3'-Ende hingegen befindet sich der Quencher, der das Signal des Reporters bis zu dessen Aktivierung unterdrückt (BIO-RAD 2006). Dies geschieht nach dem Prinzip des Fluoreszenzresonanzenergietransfers: Der Reporter sendet kurzwellige Strahlung aus, die eine höhere Emissionsenergie aufweist als langwellige Strahlung. Der

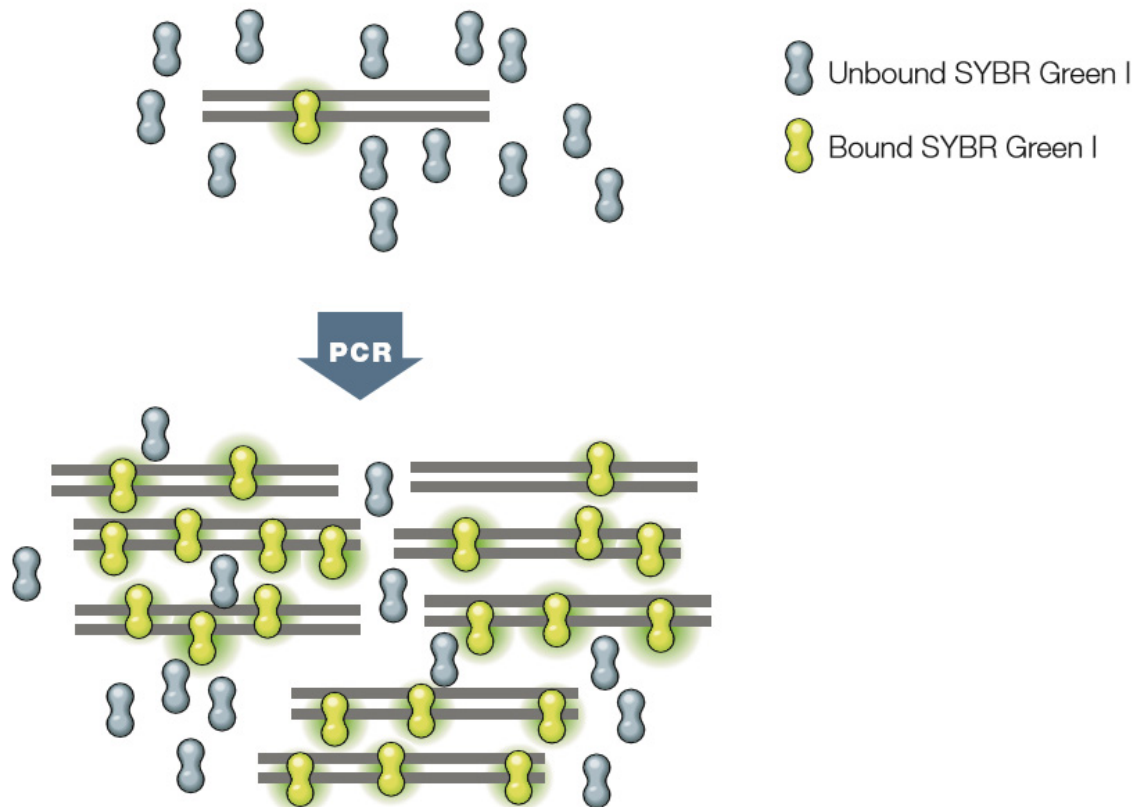
Quencher hingegen sendet langwellige Strahlung aus. Wenn Reporter und Quencher räumlich nah beieinander liegen, findet eine Übertragung der Energie des Reporters auf den Quencher statt, wodurch die kurzwellige Lichtemission unterdrückt wird (Scientific 2014; Clark 2006). Durch die 5' → 3' Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase kommt es während der Elongationsphase zu einer Abspaltung des Quenchers vom cDNA-Strang. Durch den folglich erhöhten Abstand des Reporters vom Quencher kann kein Fluoreszenzresonanzenergietransfer mehr stattfinden, sodass der Reporter nun ein fluoreszierendes Signal abgibt, das detektiert werden kann (Thiemann et al. 2015). Die 5' → 3' Exonukleaseaktivität ist nötig, um den bereits bestehenden DNA-Strang der Taq-Probe abzubauen zu können. Gleichzeitig wird der DNA-Strang anhand seiner Vorlage vervollständigt (Thiemann et al. 2015).



*Abbildung 2-2 Wirkmechanismus der TaqMan®-Probe:* Reporter und Quencher sind an eine Oligonukleotid-Sequenz gebunden, die komplementär zu einem Abschnitt der Ziel-DNA ist und an diesen spezifisch bindet. Der Quencher unterdrückt das Signal des Reporters. Durch die Taq-Polymerase (dargestellt als roter Pfeil) kommt es während der Elongation zu einer Loslösung des Reporters vom Quencher. Das Signal des Reporters wird nicht mehr vom Quencher unterdrückt und kann gemessen werden (BIO-RAD 2006, p.13).

### 2.3.3.2 SYBR® Green-Methode

SYBR® Green ist ein interkalierender, fluoreszierender Farbstoff, der sich unspezifisch an doppelsträngige DNA anlagert (Dale et al. 2012; Thiemann et al. 2015). Die Intensität des Signals steigt auf einen bis zu 1000-fachen Wert, wenn SYBR® Green an doppelsträngige DNA bindet (BIO-RAD 2006). Die Fluoreszenzintensität ist demnach proportional zur Menge an doppelsträngiger DNA und steigt im Laufe der PCR an. Bedingt durch die interkalierenden Eigenschaften von SYBR® Green ist dieses universell einsetzbar und vergleichsweise kostengünstig (Dale et al. 2012; Thiemann et al. 2015). Da an jede doppelsträngige DNA mehrere SYBR® Green-Moleküle binden, kommt es zu einer hohen Signalstärke. SYBR® Green bindet allerdings nicht spezifisch an die Ziel-DNA. Ein Anstieg der Fluoreszenz aufgrund einer Vermehrung anderer DNA-Sequenzen als der Zielsequenz ist daher möglich. Um derartige Verfälschungen der Ergebnisse (beispielsweise durch Primerdimere) auszuschließen, wird am Ende der PCR eine Schmelzkurve angefertigt. Durch eine schrittweise Temperaturerhöhung kommt es zur Auftrennung der doppelsträngigen DNA (Thiemann et al. 2015). Da der Schmelzpunkt verschiedener DNA-Abschnitte von ihrer Länge und ihrer Basensequenz abhängt, kann die Anzahl der amplifizierten Produkte erfasst werden. Idealerweise weist die Schmelzkurve lediglich einen Peak auf. Wenn die Kurve mehrere Peaks aufweist, wurde neben der Ziel-DNA ein nicht gewünschter Abschnitt amplifiziert (Dale et al. 2012). Primerdimere entstehen, wenn zwei Primer aneinander binden, anstatt sich an die Ziel-DNA anzulagern. Sie sind in der Schmelzkurve durch eine geringere Schmelztemperatur ( $T_m$ ) detektierbar (Scientific 2014). Als  $T_m$  ist jene Temperatur definiert, bei der 50% der Basenpaare eines Amplikons getrennt vorliegen (BIO-RAD 2006). Am häufigsten findet eine Primerdimerbildung in No-Template-Controls (NTC) statt, da sie keine DNA beinhalten, an die die Primer binden könnten (Scientific 2014). Bei vorgefundenen Artefakten oder Primerdimeren ist eine weitere Optimierung der PCR und/oder Verwenden neuer Primer notwendig (Dale et al. 2012).



*Abbildung 2-3 SYBR® Green-Wirkweise:* SYBR® Green sendet ein fluoreszierendes Signal aus, sobald es an doppelsträngige DNA bindet. Es ist demnach unspezifischer als die TaqMan®-Probe. Um eine Vermehrung anderer DNA-Sequenzen als der Zielsequenz auszuschließen wird eine Schmelzkurve angefertigt (BIO-RAD 2006, p.10).

### 2.3.3.3 Primerdesign

Für eine erfolgreiche spezifische Vermehrung der Zielsequenz ist es wichtig, diese zu begrenzen. Dies geschieht mit Hilfe von Primern. Das Design der Primer ist ausschlaggebend für eine erfolgreiche qPCR und muss für jede Zielsequenz angepasst werden.

Der Gehalt der Basen Guanin und Cytosin sollte bei ungefähr 50% liegen (Innis et al. 1990). Außerdem sollten die verwendeten Primer eine ähnliche Annealing-Temperatur aufweisen. Sie sollten sich demnach in ihrer Länge und Basenzusammensetzung ähneln, wobei darauf zu achten ist, dass sie keine

komplementären Sequenzen zueinander aufweisen. Sonst kommt es zu einer Bildung von Primerdimeren (Dale et al. 2012). Eine Länge von 18 bis 24 Nukleotiden ist aufgrund geeigneter Annealing-Temperaturen als ideal anzusehen (Scientific 2014).

Um in jedem PCR-Durchgang die Amplikonmenge zu verdoppeln, ist es notwendig jeweils zwei Primer zu verwenden. Diese werden forward (left hand) und reverse (right hand) Primer genannt. Der forward Primer bindet an den 3'→5' Strang und wird von links nach rechts gelesen, weshalb er auch als „left hand“ Primer bezeichnet wird. Seine Leserichtung geht demnach von 5'→3', da er komplementär an den 3'→5' DNA-Strang bindet. Der reverse Primer bindet an den zweiten Strang der DNA-Matrize, dem 5'→3' Strang und wird von rechts nach links gelesen, also vom 5'-Ende des Primers zum 3'-Ende desselben (Dale et al. 2012).

In den folgenden Analysen werden Primer verwendet, die über zwei Exon-Exon-Grenzen reichen und somit zwei Introns überspannen. Dies soll eine Amplifikation genomischer DNA ausschließen.

#### **2.3.3.4 Amplification Plot**

Bei einem Amplification Plot werden die Anzahl der PCR-Zyklen auf der x-Achse der Fluoreszenz auf der y-Achse entgegengestellt. Er dient zur Auswertung der qPCR Ergebnisse. Die Anfangsphase, bei der es noch zu keinem wesentlichen Anstieg der Fluoreszenz kommt, bezeichnet man als Baseline (Biosystems 2008). Um einen eindeutigen Rückschluss auf die Ausgangsmenge treffen zu können, ist es unumgänglich einen Punkt zu definieren, ab dem das Fluoreszenzsignal einheitlich gewertet wird. Dieser Zeitpunkt wird im Amplification Plot als Threshold bezeichnet. Der Quantification Cycle ( $C_q$ ) gibt Aufschluss darüber, wie viele PCR-Zyklen notwendig sind, um den konstant definierten Threshold zu überschreiten (Pfaffl 2004). Der  $C_q$  verhält sich indirekt proportional zur Ausgangsmenge des Amplikons. Er ist demnach höher bei einer geringen Ausgangsmenge, da mehr Zyklen notwendig sind um eine ausreichende Fluoreszenz zu erreichen, die den Threshold überschreitet (Scientific 2014). Nach einem exponentiellen Anstieg kommt es zu einem Abflachen der Kurve. Dies geschieht unter anderem durch eine Limitation der Reaktionsprodukte. Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge an

DNA lassen sich deshalb ausschließlich während der exponentiellen Phase treffen (BIO-RAD 2006).

### 2.3.3.5 Relative Quantifizierung und Referenzgen

Bei der relativen Quantifizierung wird die Genexpression des Zielgens auf ein Referenzgen bezogen (Pfaffl 2004). Dies geschieht um experimentelle Unterschiede, wie eine unterschiedliche Ausgangsmenge an RNA, rechnerisch ausgleichen zu können. Am häufigsten werden „Housekeeping-Gene“ als Referenzgene verwendet. Housekeeping-Gene sind für grundlegende Abläufe der Zelle verantwortlich. Sie werden in jeder Zelle exprimiert. Referenzgene sollten durch Umwelteinflüsse, wie beispielsweise Medikamentengabe, nicht beeinflusst werden und eine ähnliche Expressionsrate aufweisen wie das Zielgen. Eine ähnliche Expressionsrate ist durch ähnliche  $C_q$ -Werte erkennbar (Chapman & Waldenström 2015). Bei der relativen Quantifizierung macht im Gegensatz zur absoluten Quantifizierung nicht die absolute Anzahl der PCR-Produkte das Ergebnis aus. Dieses wird hingegen anhand eines Verhältnisses ausgedrückt. Beispielsweise kann die Aussage getroffen werden, dass das Zielgen nach einer Therapie zweimal häufiger vorliegt als vor der Therapie (Livak & Schmittgen 2001). Für *ARNTL* und *MAO-A* wurde das ribosomale Referenzgen 18s verwendet, für *CHOP* und *BiP HPRT1*.

### 2.3.3.6 DeltaC<sub>q</sub>

Für die anschließende statistische Analyse werden die DeltaC<sub>q</sub> (dC<sub>q</sub>)-Daten herangezogen. Diese lassen sich nach folgender Formel berechnen:

$$dC_q = C_q (\text{Zielgen}) - C_q (\text{Referenzgen})$$

Dies dient, wie in Kapitel 2.3.3.5 „Relative Quantifizierung und Referenzgen“ näher beschrieben, zu einer Normalisierung der Ungenauigkeiten der cDNA-Synthese sowie experimenteller Unterschiede. Bei einem negativen dC<sub>q</sub>-Wert wurde das Zielgen häufiger exprimiert als das Referenzgen. Dies lässt sich aus der Formel

herleiten: Um einen Minuswert zu ergeben, muss der Cq-Wert des Referenzgens höher sein als der des Zielgens. Ein höherer Cq-Wert steht für eine geringere Ausgangsmenge der Zielsequenz. Demnach wurde das Zielgen häufiger exprimiert als das Referenzgen.

### 2.3.3.7 Effizienz und wichtige Qualitätskriterien

Die Effizienz der qPCR lässt sich anhand folgender Formel berechnen:

$$C_n = C_i \times (1 + E)^n$$

$C_n$ ...Menge der DNA-Kopien zum Zeitpunkt „ $n$ “

$C_i$ ...Ausgangsmenge der DNA

$E$ ...Effizienz

$n$ ... Zyklus der qPCR

Durch Einsetzen der maximalen Effizienz (nämlich 1, dies entspricht 100%) erhält man folgende Gleichung:

$$C_n = C_i \times (1 + 1)^n \rightarrow C_n = C_i \times 2^n$$

Wie aus der Gleichung ersichtlich verdoppelt sich die DNA bei jedem Zyklus, wenn eine Effizienz von 100% angenommen wird (Biosystems 2008). Für ein optimales qPCR-Ergebnis ist eine Effizienz nahe 100% anzustreben. Um zuverlässige Ergebnisse zu erzielen, sollte sich die Effizienz zwischen 95 und 105% bewegen. Suboptimale qPCR-Bedingungen sowie eine schlechte Optimierung der Primer spiegeln sich in einer geringen Effizienz wider. Zu einer Effizienz von über 105% kann es durch Primerdimere oder Verunreinigung der Proben kommen (BIO-RAD 2006). Zur Überprüfung der Effizienz wird eine Verdünnungsreihe angefertigt, aus der sich eine Standardkurve berechnen lässt.

## **2.4 Durchführung**

### **2.4.1 Blutentnahmen**

Die Blutentnahmen erfolgten an nüchternen StudienteilnehmerInnen zwischen 8:30 und 9:30 morgens. Es wurden Lithium-Heparin Röhrchen verwendet. Diese wurden alsbald (spätestens aber eine Stunde nach der Blutentnahme) für die weitere Analyse zum Institut für Pathophysiologie und Immunologie der Medizinischen Universität Graz, Österreich, gebracht.

### **2.4.2 PBMC-Isolation mit Ficoll-Histopaque®**

Für die anschließende RNA-Isolation wurden die PBMCs aus dem abgenommenen Vollblut mithilfe der Histopaque®-Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) von den anderen Blutbestandteilen getrennt. Der Vorgang richtete sich nach der „Standard Operating Procedure“ (SOP) des Instituts für Pathophysiologie und Immunologie in Graz, Österreich.

Die PBMC-Gewinnung erfolgte unter sterilen Bedingungen. Es wurde unter der Lamina gearbeitet. Die Arbeitsfläche wurde vor Beginn zwanzig Minuten zum Desinfektionszwecke mit UV-Licht bestrahlt. Der Arbeitsplatz wurde mit hochprozentigem Alkohol gereinigt. Gearbeitet wurde mit sterilen Handschuhen um eine Kontamination mit RNase zu vermeiden. 9 ml Histopaque®-1077 (Sigma Aldrich) wurden in ein 50 ml Röhrchen (Sarstedt®) pipettiert. Das abgenommene Vollblut wurde in ein weiteres 50 ml Röhrchen überführt und mit 8 ml Calcium and Magnesium Free Phosphate Buffered Saline (CMF-PBS) verdünnt. Der Inhalt wurde in das 50 ml Röhrchen (Sarstedt®) mit Vollblut übertragen, wodurch das Blut 1:1 mit CMF-PBS verdünnt war. 16 ml Vollblut-CMF-PBS-Mischung wurden über die Histopaque®-Lösung geschichtet. Das 50 ml Röhrchen mit Histopaque® wurde schräg gehalten, um eine Vermischung zu vermeiden. Anschließend wurde bei 400 g ungekühlt für 30 min ohne Bremse zentrifugiert, um die gewünschte Schichtaufteilung zu erhalten. Folgend konnte die Interphase, die die PBMCs enthalten hat, mit einer sterilen Einmalpasteurpipette (Sarstedt®) abgehoben werden. Diese wurde mit geringen Teilen der darüber befindlichen Phase aus Plasma und Phosphatpuffer in ein 50 ml Röhrchen übertragen. Das 50 ml

Röhrchen wurde anschließend auf 30 ml mit CMF-PBS befüllt. Die weiteren Schritte dienten zur bestmöglichen Entfernung anderer Bestandteile wie Plasma und Thrombozyten. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 400 g für 10 min mit schwacher Bremse bei einer Kühlung auf 4°C. Der Überstand wurde abdekantiert und das überbleibende Zellpellet mit 30 ml CMF-PBS resuspendiert. Erneute Zentrifugation bei 400g für 10 min mit schwacher Bremse bei einer Kühlung auf 4°C. Der Überstand wurde abgegossen und das Zellpellet mit 1 ml CMF-PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Röhrchen überführt, abzentrifugiert und der Überstand sorgfältig abgehoben. Das Zellpellet wurde bis zur RNA Isolation bei minus 20°C gelagert.

### **2.4.3 RNA-Isolation mit TRI Reagent RT®**

Die RNA-Isolation erfolgte nach der SOP des Instituts für Pathophysiologie und Immunologie der Medizinischen Universität Graz, Österreich. Die SOP befindet sich im Anhang. Aus ihr sind die genauen Arbeitsschritte ersichtlich.

### **2.4.4 cDNA-Synthese mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems/Thermo Fisher**

Die mRNA wurde mit Hilfe des „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA) in cDNA umgeschrieben. Gearbeitet wurde in zwei Durchgängen zu je 16 Proben. Um einer Degradierung der RNA entgegenzuwirken wurde auf Eis gearbeitet.

Die RNA wurde auf 100 ng/µl verdünnt und mit nukleasefreiem Wasser auf 15 µl Gesamtvolumen gebracht. Dabei wurde auf eine ausgeglichene Verteilung der RNA in der Flüssigkeit geachtet, was durch dreimaligen Pipettenhochzug sowohl im Ursprungs- als auch im Endgefäß erreicht wurde. Die Proben mit der Kennziffer 2, 4, 23 sowie 30 wurden unverdünnt verwendet, da ihre RNA-Konzentration unter 100 ng/µl liegt und somit bereits ohne Verdünnung gering war.

*Tabelle 2-1 Mischungsverhältnis von nukleasefreiem Wasser und RNA um eine Konzentration von 100 ng/μl bei einem Endvolumen von 15 μl zu erreichen*

Kennziffer	Konz. [ng/μl]	RNA [μl]	H <sub>2</sub> O [μl]
1	185,26	8,10	6,90
2	43,57		
3	461,31	3,25	11,75
4	45,61		
5	175,67	8,54	6,46
6	223,4	6,71	8,29
7	415,86	3,61	11,39
8	224,44	6,68	8,32
9	206,76	7,25	7,75
10	246,97	6,07	8,93
11	334,84	4,48	10,52
12	291,86	5,14	9,86
13	234,61	6,39	8,61
14	218,5	6,86	8,14
15	282,95	5,30	9,70
16	183,23	8,19	6,81
17	382,22	3,92	11,08
18	192,45	7,79	7,21
19	202,77	7,40	7,60
20	414,13	3,62	11,38
21	162,19	9,25	5,75

22	254,3	5,90	9,10
23	83,8		
24	346,08	4,33	10,67
25	281,86	5,32	9,68
26	239,06	6,27	8,73
27	390,48	3,84	11,16
28	141,4	10,61	4,39
29	203,35	7,38	7,62
30	61,12		
31	218,53	6,86	8,14

10 µl der verdünnten RNA wurden aus den 15 µl entnommen und in für den Thermocycler passende 0,2 ml Eppendorftuben übertragen.

Der Mastermix wurde für 16,5 Proben erstellt. 0,5 µl dienen als Reserve.

*Tabelle 2-2 Volumina des Mastermixes für 16,5 Proben für die cDNA-Synthese. Die einzelnen Bestandteile sind in Kapitel 2.3.2. „cDNA-Synthese“ näher beschrieben.*

Für 16,5 Proben	µl
10x RT Puffer	33
25x dNTP-Mix (100 mM)	13,2
10x Random Primer	33
Enzym	16,5
H <sub>2</sub> O	69,3
Gesamtvolumen	165

Reverse Transkriptase negative Proben (RT-) bezeichnen eine Negativkontrolle ohne Enzym, die als Kontrolle dient. Sie wurde nach folgendem Schema erstellt:

*Tabelle 2-3 RT- Pipettierschema*

Substanz	$\mu\text{l}$
<b>10x RT Puffer</b>	2,00
<b>25x dNTP-Mix (100 mM)</b>	0,80
<b>10x Random Primer</b>	2,00
<b>Enzym</b>	0,00
<b>H<sub>2</sub>O</b>	5,20
<b>Gesamtvolumen</b>	10,00

Jeweils 10  $\mu\text{l}$  Mastermix wurden zu den 0,2 ml Eppendorfgefäßen, die die RNA beinhalten, hinzugefügt. Die RT- Proben wurden ebenfalls in zwei der 0,2 ml Eppendorfgefäße hinzugefügt (da in zwei Durchgängen gearbeitet wurde). Eine anschließende Zentrifugation trug dazu bei, alle Bestandteile auf den Boden des Röhrchens zu bringen. Danach wurde der Thermocycler C1000 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) mit den 0,2 ml Eppendorf Gefäßen beladen und mit folgendem Temperaturprogramm gestartet:

*Tabelle 2-4 Thermocycler-Programm der cDNA-Synthese*

Thermocycler-Programm	
<b>10 min</b>	25°C
<b>120 min</b>	37°C
<b>5 sek</b>	85°C
$\infty$	4°C

## 2.4.5 qPCR

### 2.4.5.1 TaqMan®-qPCR von *ARNTL*, *MAO-A* sowie dem ribosomalen Referenzgen 18s

Die gewonnene cDNA wurde von 50 ng/µl auf 5 ng/µl verdünnt. 4 µl der cDNA wurden nach dem in der Tabelle 2-5 ersichtlichen Schema auf eine 96-Well-Platte aufgetragen.

*Tabelle 2-5 Pipettierschema der qPCR mit TaqMan® zur Analyse von ARNTL, MAO-A sowie dem ribosomalen Referenzgen 18s:* Die Zahl „1“ vor jeder Zahl ist kennzeichnend für „1 mal“. Jede Probe wurde dreimal aufgetragen um anschließend einen Mittelwert berechnen zu können. Bei der NTC handelt es sich um eine Negativkontrolle. Anstelle der cDNA wurde lediglich destilliertes H<sub>2</sub>O verwendet. Falls es zu einem positiven Ergebnis der NTC gekommen wäre, wäre von einer Verunreinigung der Proben ausgegangen worden. In den RT- Proben befand sich RNA, da sie nicht mit dem Enzym RT versehen wurden und somit die cDNA-Synthese nicht initiiert worden war. Da die cDNA in zwei Durchgängen generiert wurde, liegen zwei RT- Proben vor. RT- dienen ebenfalls als Kontrolle und dürfen erst 5 Zyklen nach den cDNA-Proben den Threshold überschreiten um die Qualität der qPCR zu gewährleisten.

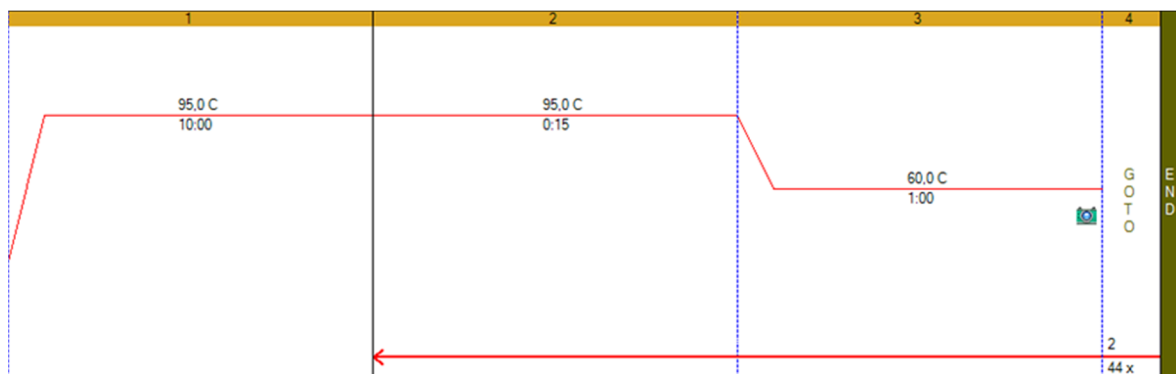
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 1	1 1	1 1	1 9	1 9	1 9	1 17	1 17	1 17	1 25	1 25	1 25
B	1 2	1 2	1 2	1 10	1 10	1 10	1 18	1 18	1 18	1 26	1 26	1 26
C	1 3	1 3	1 3	1 11	1 11	1 11	1 19	1 19	1 19	1 27	1 27	1 27
D	1 4	1 4	1 4	1 12	1 12	1 12	1 20	1 20	1 20	1 28	1 28	1 28
E	1 5	1 5	1 5	1 13	1 13	1 13	1 21	1 21	1 21	1 29	1 29	1 29
F	1 6	1 6	1 6	1 14	1 14	1 14	1 22	1 22	1 22	1 30	1 30	1 30
G	1 7	1 7	1 7	1 15	1 15	1 15	1 23	1 23	1 23	1 31	1 31	1 31
H	1 8	1 8	1 8	1 16	1 16	1 16	1 24	1 24	1 24	1 RT-	1 NTC	1 RT-

Der Mastermix wurde, wie in Tabelle 2-6 ersichtlich, für die 96 Reaktionen der 96-Well-Platte pipettiert. Die cDNA und ihre Negativkontrollen befanden sich bereits auf der 96-Well-Platte und wurden nach Fertigstellung des Mastermixes mit diesem zusammengeführt.

*Tabelle 2-6 Volumina des Mastermixes für die qPCR von ARNTL, MAO-A sowie dem ribosomalen Referenzgen 18s.*

	Pro Reaktion [µl]	Für 96 Reaktionen [µl]
<b>20x Genexpression Assay</b>	0,5	48
<b>2x TaqMan® MM</b>	5	480
<b>cDNA 20ng 1:10</b>	4	384
<b>H<sub>2</sub>O</b>	0,5	48
<b>Gesamt:</b>	10	960

Der Thermocycler “CFX96 real-time PCR detection System” (Bio-Rad) wird mit folgendem Programm gestartet:



*Abbildung 2-4 Thermocyclerprogramm für ARNTL, MAO-A und dem ribosomalen Referenzgen 18s*

- 95°C für 10 min
- 95°C für 15 s
- 60°C für 1 min
- b-c wird 44 x wiederholt

Die qPCR mit TaqMan® wurde insgesamt dreimal anhand dieses Protokolls durchgeführt: für ARNTL, MAO-A sowie das ribosomale Referenzgen 18s.

### 2.4.5.2 SYBR® Green-qPCR von *CHOP*, *BiP* und dem Referenzgen *HPRT1*

Die cDNA wurde auf 5 ng/µl verdünnt. Jeweils drei Teile cDNA zu je 4 µl der Proben 1-31 wurden auf die 96-Well-Platte pipettiert.

*Tabelle 2-7 Pipettierschema der qPCR von CHOP, BiP sowie dem Referenzgen HPRT1*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 1	1 1	1 1	1 9	1 9	1 9	1 17	1 17	1 17	1 25	1 25	1 25
B	1 2	1 2	1 2	1 10	1 10	1 10	1 18	1 18	1 18	1 26	1 26	1 26
C	1 3	1 3	1 3	1 11	1 11	1 11	1 19	1 19	1 19	1 27	1 27	1 27
D	1 4	1 4	1 4	1 12	1 12	1 12	1 20	1 20	1 20	1 28	1 28	1 28
E	1 5	1 5	1 5	1 13	1 13	1 13	1 21	1 21	1 21	1 29	1 29	1 29
F	1 6	1 6	1 6	1 14	1 14	1 14	1 22	1 22	1 22	1 30	1 30	1 30
G	1 7	1 7	1 7	1 15	1 15	1 15	1 23	1 23	1 23	1 31	1 31	1 31
H	1 8	1 8	1 8	1 16	1 16	1 16	1 24	1 24	1 24	1 RT-	1 NTC	1 RT-

Der SYBR® Green-Mastermix wurde nach folgender Tabelle hergestellt.

*Tabelle 2-8 Volumina des Mastermixes für die qPCR von CHOP, BiP sowie dem Referenzgen HPRT1*

	Pro Reaktion [µl]	Für 97 Reaktionen [µl]
<b>iQ SYBR Green Supermix</b>	7,5	727,5
<b>Forward Primer 0,2 µM</b>	0,3	29,10
<b>Reverse Primer 0,2 µM</b>	0,3	29,10
<b>cDNA 5 ng/µl 1:10</b>	4	388,00
<b>H<sub>2</sub>O</b>	2,9	281,30
<b>Gesamt:</b>	15	1455,00

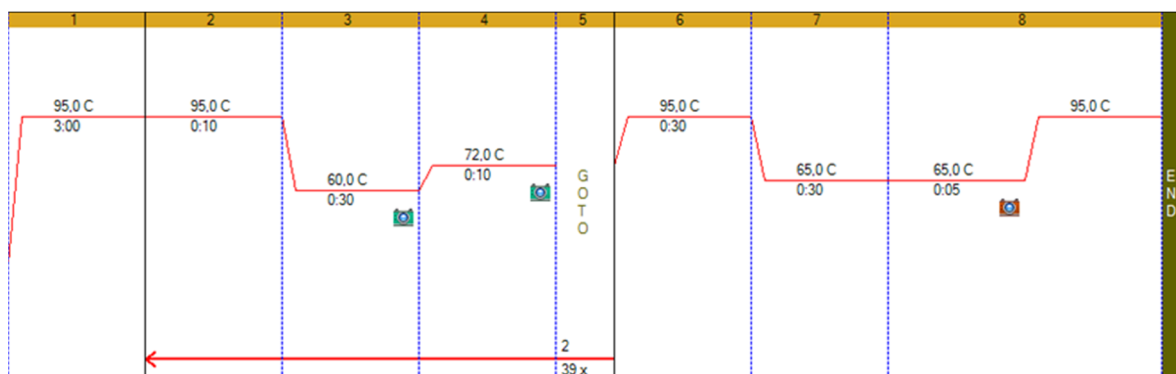
Für *CHOP*, *BiP* und das Referenzgen *HPRT1* wurden unterschiedliche Primer verwendet, die sich an die jeweils gewünschte Region der cDNA anlagerten und in Folge zu einer spezifischen Vermehrung führten.

*Tabelle 2-9 Primersequenzen von CHOP, BiP und HPRT1*

Primer		Größe
<b>CHOP</b>	Forward: 5'-GCCTTTCTCTTCGGACACTG-3'	380 bp
	Reverse: 5'-TCACCATTTCGGTCAATCAGA-3'	
<b>BiP</b>	Forward: 5'-TGCAGCAGGACATCAAGTTC-3'	159 bp
	Reverse: 5'-CGCTGGTCAAAGTCTTCTCC-3'	
<b>HPRT1</b>	Forward: 5'-GACCAGTCAACAGGGGACAT-3'	111 bp
	Reverse: 5'-CTGCATTGTTTTGCCAGTGT-3'	

11 µl des SYBR® Green-Mastermixes wurden zu den Proben der 96-Well-Platte pipettiert. Somit wurde ein Reaktionsvolumen von insgesamt 15 µl erreicht.

Der Thermocycler „CFX96 real-time Detection System“ (Bio-Rad) wurde mit folgendem Programm gestartet:



*Abbildung 2-5 Thermocyclerprogramm für CHOP, BiP und HPRT1*

Die qPCR mit SYBR® Green wurde insgesamt dreimal anhand dieses Protokolls durchgeführt: für *CHOP*, *BiP* und *HPRT1*.

## 2.5 Statistische Analyse

Alle statistischen Analysen wurden mit SPSS Version 23 (IBM Corp., Armonk, NY) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p < .05$  gewählt. Für die deskriptive Statistik wird der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angeführt, bei fehlender Normalverteilung der Median. Die Daten wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft. Zusätzlich fand eine visuelle Überprüfung mittels Histogrammen, Q-Q-Plots und Boxplots statt. Um sowohl die Fragestellung zu behandeln ob es einen Unterschied zwischen der BD- und der Kontrollgruppe als auch ob es einen Unterschied zwischen den affektiven Phasen der BD (depressive Phase, manische Phase) und der euthymen Phase gibt, wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test zweimal angewandt. Der Levene-Test wurde zur Überprüfung der Homogenität der Varianzen eingesetzt.

Um die Hypothesen 1 *„Bei BD kommt es zu einer signifikant erniedrigten Expression von ARNTL und MAO-A im Vergleich zu gesunden Kontrollen“*, 2 *„Bei BD kommt es zu einer signifikant erhöhten Expression von BiP im Vergleich zu gesunden Kontrollen“* und 3 *„Bei BD kommt es zu einer signifikant erniedrigten Expression von CHOP im Vergleich zu gesunden Kontrollen“* zu prüfen, wurde bei einer Inhomogenität der Varianzen der nicht parametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet. Um auch die Kovariaten zu berücksichtigen, wurde das robuste Verfahren der Kovarianzanalyse (ANCOVA, engl. „Analysis of covariance“) auch bei nicht parametrischer Verteilung durchgeführt. Relevante Kovariaten wurden aus der Literatur übernommen. Des Weiteren werden Einflüsse der Kohortenzusammensetzung in Kapitel 3.1 „Kohortenbeschreibung“ beschrieben und wurden gegebenenfalls in die Analyse miteinbezogen. Folgendes ANCOVA-Model wurde zur Analyse der Daten angewandt:

- unabhängige Variable: Gruppe (BD- und Kontrollgruppe)
- abhängige Variable: Genexpressionsmarker
- Kovariaten: Geschlecht (m/w), Alter (metrisch), BMI (metrisch), Lithium (ja/nein) und Antiepileptika (ja/nein)

Um die Hypothesen 1a *„In affektiven Phasen der BD kommt es zu einer signifikant erniedrigten Expression von ARNTL und MAO-A im Vergleich zur euthymen*

Phase“, 2a „In affektiven Phasen der BD kommt es zu einer signifikant erhöhten Expression von BiP im Vergleich zur euthymen Phase“ und 3a „In affektiven Phasen der BD kommt es zu einer signifikant erhöhten Expression von CHOP im Vergleich zur euthymen Phase“ zu untersuchen, wurde bei einer Homogenität der Varianzen folgendes ANCOVA-Modell zur Analyse der Daten angewandt:

- unabhängige Variable: Gruppen (euthyme, depressive, manische Phase)
- abhängige Variable: Genexpressionsmarker
- Kovariaten: Geschlecht (m/w), Alter (metrisch), Lithium (ja/nein) und Antiepileptika (ja/nein)

Bei nicht gegebener Normalverteilung wurde zusätzlich der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt.

Die Unterteilung der Gruppen erfolgte nach folgendem Schema:

- Euthym: HAMD < 9, YMRS < 8,  $n = 44$
- Depressiv: HAMD  $\geq 9$ , YMRS < 8,  $n = 25$
- (Hypo)man: HAMD < 9, YMRS  $\geq 8$ ,  $n = 15$

Um die 4. Hypothese „ER-Stressmarker korrelieren mit der Genexpression von ARNTL und MAO-A“ zu untersuchen, wurde der Spearman-Korrelationskoeffizient verwendet.

### 3 Ergebnisse – Resultate

#### 3.1 Kohortenbeschreibung

Die Kohorte besteht aus 135 StudienteilnehmerInnen. Die BD-Gruppe umfasst 81, die Kontrollgruppe 54 TeilnehmerInnen. Von den 81 BD-TeilnehmerInnen waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme 46 euthym, 23 depressiv und 10 manisch. Für drei Personen lagen zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine HAMD- und YMRS-Werte vor, weshalb sie durch Voruntersuchungen zwar der BD-Gruppe, nicht aber einer bestimmten Phase zugeordnet werden konnten. Vorab wurden die Daten auf ihre Plausibilität mittels Häufigkeitstabellen und Graphiken geprüft. Ein Messwert von MAO-A wich dabei stark von der Grundgesamtheit ab, wurde aber wegen seiner Plausibilität beibehalten.

In der folgenden Tabelle ist die erfolgte Kohortenanalyse ersichtlich. Unterschiede der Gruppen werden aufgezeigt.

*Tabelle 3-1 Kohortenanalyse der BD- und Kontrollgruppe: Signifikante Gruppenunterschiede sind in der rechten Spalte mit dem Zusatz  $p < .05$  vermerkt.*

	<i>BD-Gruppe</i>	<i>Kontrollgruppe</i>	<i>Unterschiede</i>
<b>ProbandInnen (n)</b>	81	54	
<b>Alter [Jahre]</b>	41 ± 13	39 ± 16	
<b>Männer (n)</b>	45	17	<b><math>p &lt; .05</math></b>
<b>Frauen (n)</b>	36	37	
<b>BMI [kg/m<sup>2</sup>]</b>	28.05 ± 5.01	25.26 ± 4.33	<b><math>p &lt; .05</math></b>
<b>Raucher (n)</b>	39	19	
<b>Lithium (n)</b>	37	0	
<b>Antiepileptika (n)</b>	26	0	
<b>Atypische Neuroleptika (n)</b>	49	0	
<b>SSRI (n)</b>	22	0	

*Tabelle 3-2 Kohortenanalyse der verschiedenen Phasen der BD*

	Euthymie	Depressive Phase	Manische Phase
<b>ProbandInnen (n)</b>	46	23	10
<b>Alter [Jahre]</b>	42 ± 14	39 ± 12	40 ± 16
<b>Männer (n)</b>	28	10	5
<b>Frauen (n)</b>	18	13	5
<b>BMI [kg/m<sup>2</sup>]</b>	28 ± 5	28 ± 5	29 ± 5
<b>Raucher (n)</b>	22	11	5
<b>Lithium (n)</b>	19	15	3
<b>Antiepileptika (n)</b>	16	6	4
<b>Atypische Neuroleptika (n)</b>	25	18	4
<b>SSRI (n)</b>	13	7	2

### 3.2 Hypothese 1 „Bei BD kommt es zu einer signifikant erniedrigten Expression von ARNTL und MAO-A im Vergleich zu gesunden Kontrollen“

Die Genexpression von *ARNTL* und *MAO-A* ist nicht normalverteilt. Die Varianzen von *ARNTL* sind im Gegensatz zu *MAO-A* zudem nicht homogen.

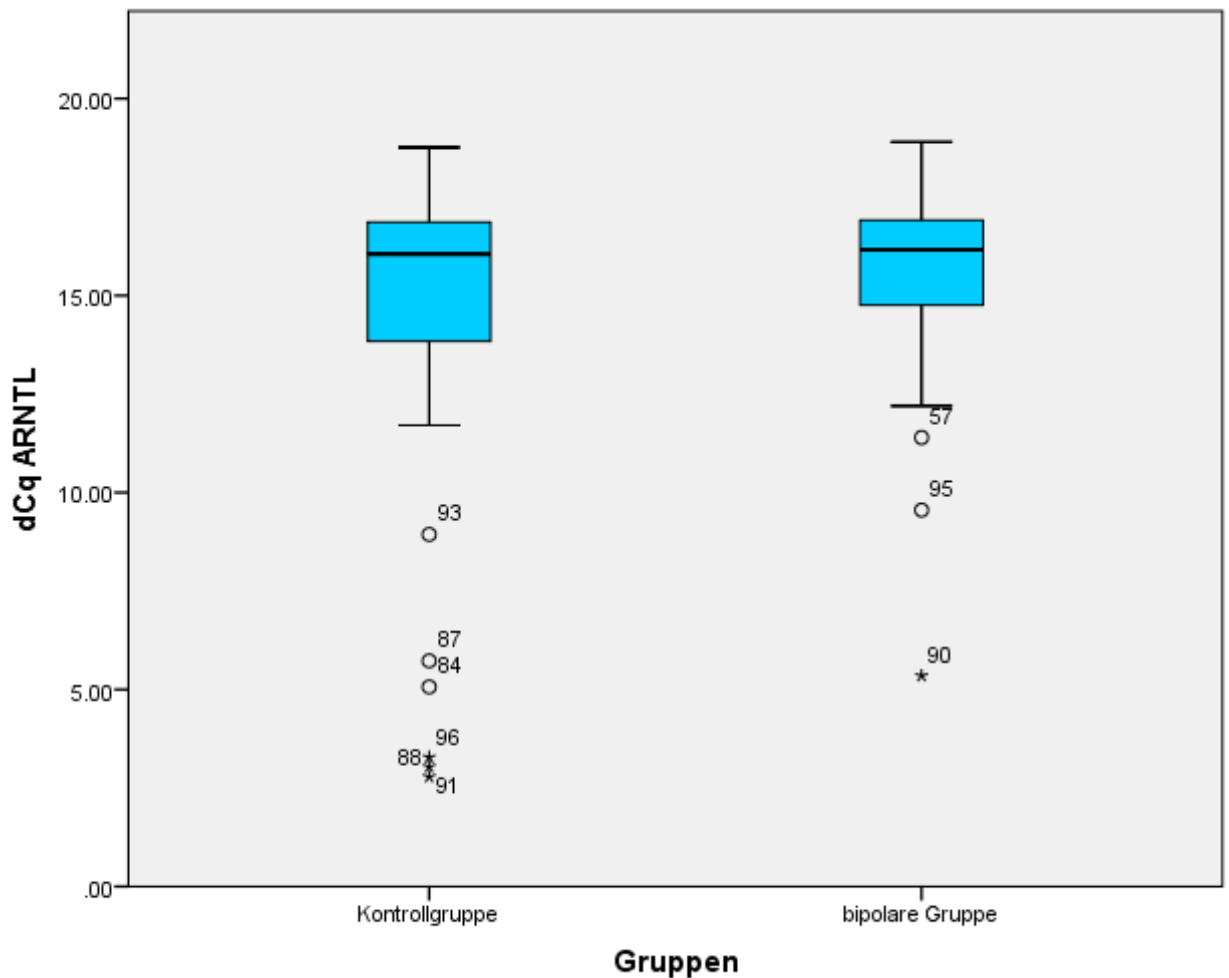


Abbildung 3-1 Boxplot der Genexpression von *ARNTL* in der BD- und Kontrollgruppe. *ARNTL* unterschied sich nicht signifikant zwischen Individuen mit BD und Kontrollen ( $p = .57$ ).

Der Mann-Whitney-U-Test zeigte keinen signifikanten Unterschied der *ARNTL*-Expression zwischen der BD-Gruppe (mittlerer Rang = 68.54,  $n = 80$ ) und der Kontrollgruppe (mittlerer Rang = 64.67,  $n = 53$ ), (Mann-Whitney  $U = 1996.5$ ,  $z = -.57$ ,  $p = .57$ , 2-seitig). Relativiert zum ribosomalen Referenzgen 18s betrug der Median der dCq-Werte von *ARNTL* in der BD-Gruppe 16.16. Der Median der dCq-Werte von *ARNTL* der Kontrollgruppe lag bei 16.05. Die zusätzlich durchgeführte

ANCOVA erzielte ebenfalls kein signifikantes Ergebnis ( $F(1/126) = 1.49, p = .22$ ). Die *ARNTL*-Expression unterschied sich demnach nicht signifikant zwischen Individuen mit BD und Kontrollen.

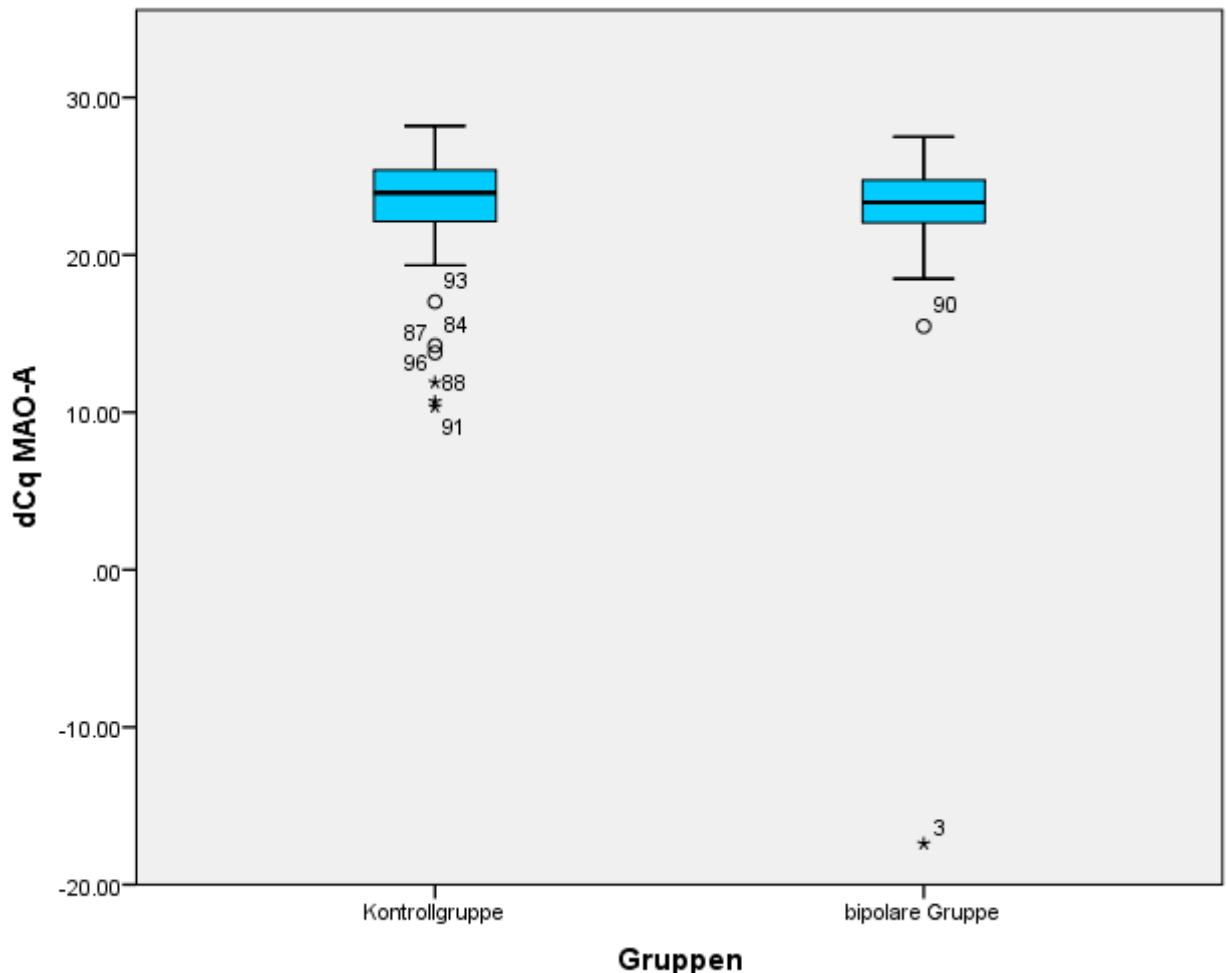


Abbildung 3-2 Boxplot der Genexpression von *MAO-A* der BD- und Kontrollgruppe. Die Genexpression von *MAO-A* zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Individuen mit BD und Kontrollen ( $p = .16$ ).

Mittels ANCOVA konnte kein signifikanter Unterschied der Genexpression von *MAO-A* zwischen der BD- und Kontrollgruppe festgestellt werden ( $F(1/126) = 1.99, p = .16$ ). Der zusätzlich durchgeführte Mann-Whitney-U-Test zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied der *MAO-A*-Expression zwischen der BD-Gruppe (mittlerer Rang = 63.37,  $n = 81$ ) und der Kontrollgruppe (mittlerer Rang = 69.54,  $n = 52$ ), (Mann-Whitney  $U = 1974, z = -.61, p = .54, 2$ -seitig). Relativiert zum ribosomalen Referenzgen 18s hatten BD-PatientInnen einen Median der dCq-Werte von *MAO-A* von 23.34, der Median der Kontrollgruppe lag bei 23.94.

Demnach zeigte die Genexpression von *MAO-A* keinen signifikanten Unterschied zwischen Individuen mit BD und Kontrollen.

### 3.2.1 Hypothese 1a „In affektiven Phasen der BD kommt es zu einer signifikant erniedrigten Expression von *ARNTL* und *MAO-A* im Vergleich zur euthymen Phase“

Sowohl *ARNTL* als auch *MAO-A* waren nicht normalverteilt, wiesen aber homogene Varianzen auf. Eine ANCOVA wurde zur Analyse der Daten gewählt. Der nicht parametrische Kruskal-Wallis-Test wurde zusätzlich durchgeführt.

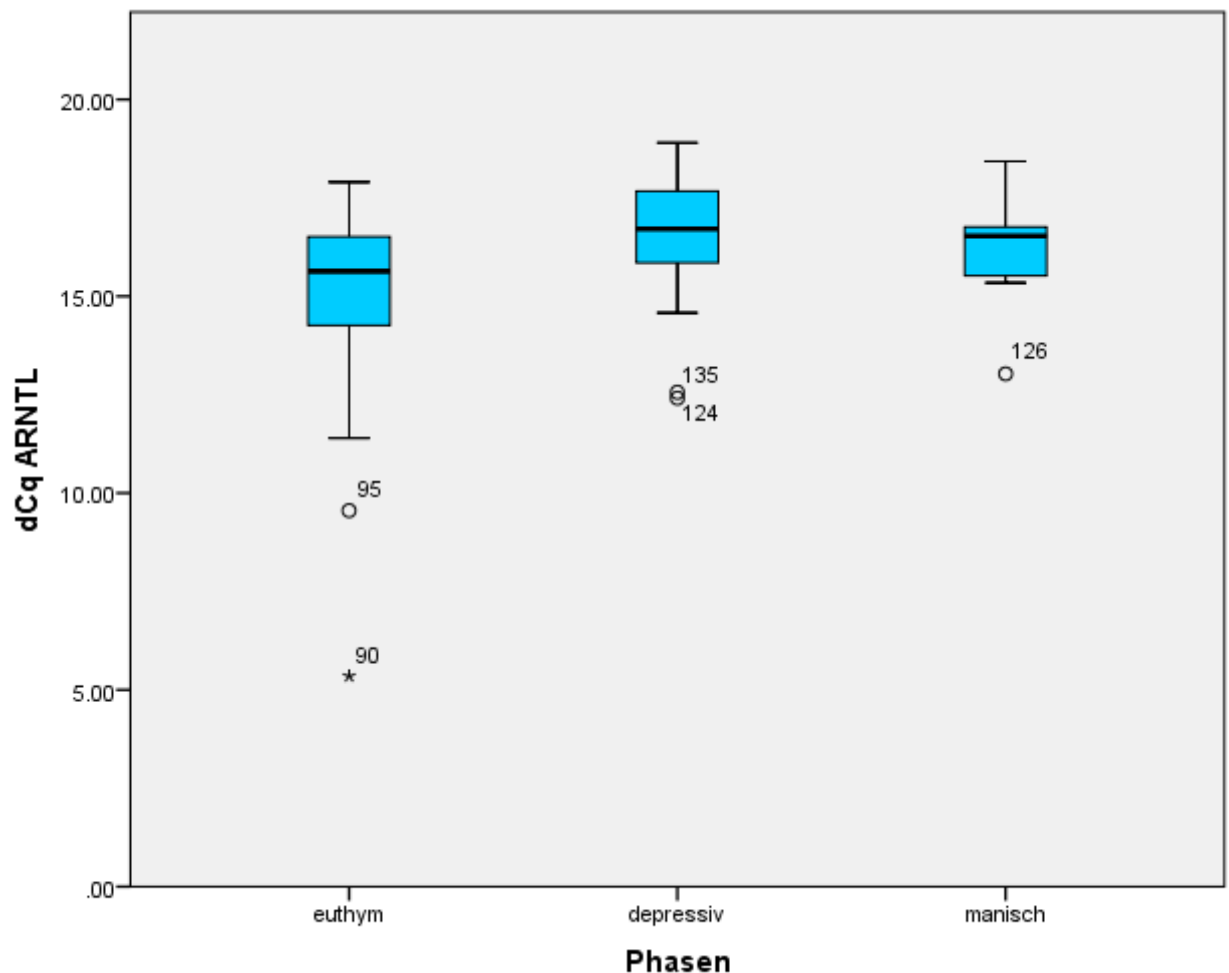


Abbildung 3-3 Boxplot der Genexpression von *ARNTL*. Unterteilung der BD-Gruppe in eine euthyme, depressive sowie manische Gruppe. **BD-PatientInnen in einer affektiven Phase unterschieden sich signifikant von BD-PatientInnen in einer euthymen Phase ( $p = .047$ ).**

Mittels ANCOVA konnte ein signifikanter Unterschied der *ARNTL*-Expression zwischen affektiven und euthymen Phasen der BD festgestellt werden ( $F(2/78) = 3.20, p = .047$ ). Der Median der dCq-Werte von *ARNTL* der euthymen Gruppe ( $n = 45$ ) betrug 15.63, jener der depressiven Gruppe ( $n = 23$ ) 16.71 und jener der manischen Gruppe ( $n = 10$ ) 16.53. Der Post-hoc-Test (Tukey) zeigte einen signifikanten ( $p = 0.03$ ) Unterschied der Genexpression von *ARNTL* zwischen der euthymen und der depressiven Gruppe (-1.38, 95% - KI [-2.64, -0.13]). Der Kruskal-Wallis-Mediantest bei unabhängigen Stichproben konnte ebenfalls einen signifikanten Unterschied der Genexpression von *ARNTL* zwischen affektiven und euthymen Phasen nachweisen ( $\chi^2(2) = 6.61, p = .04$ ).

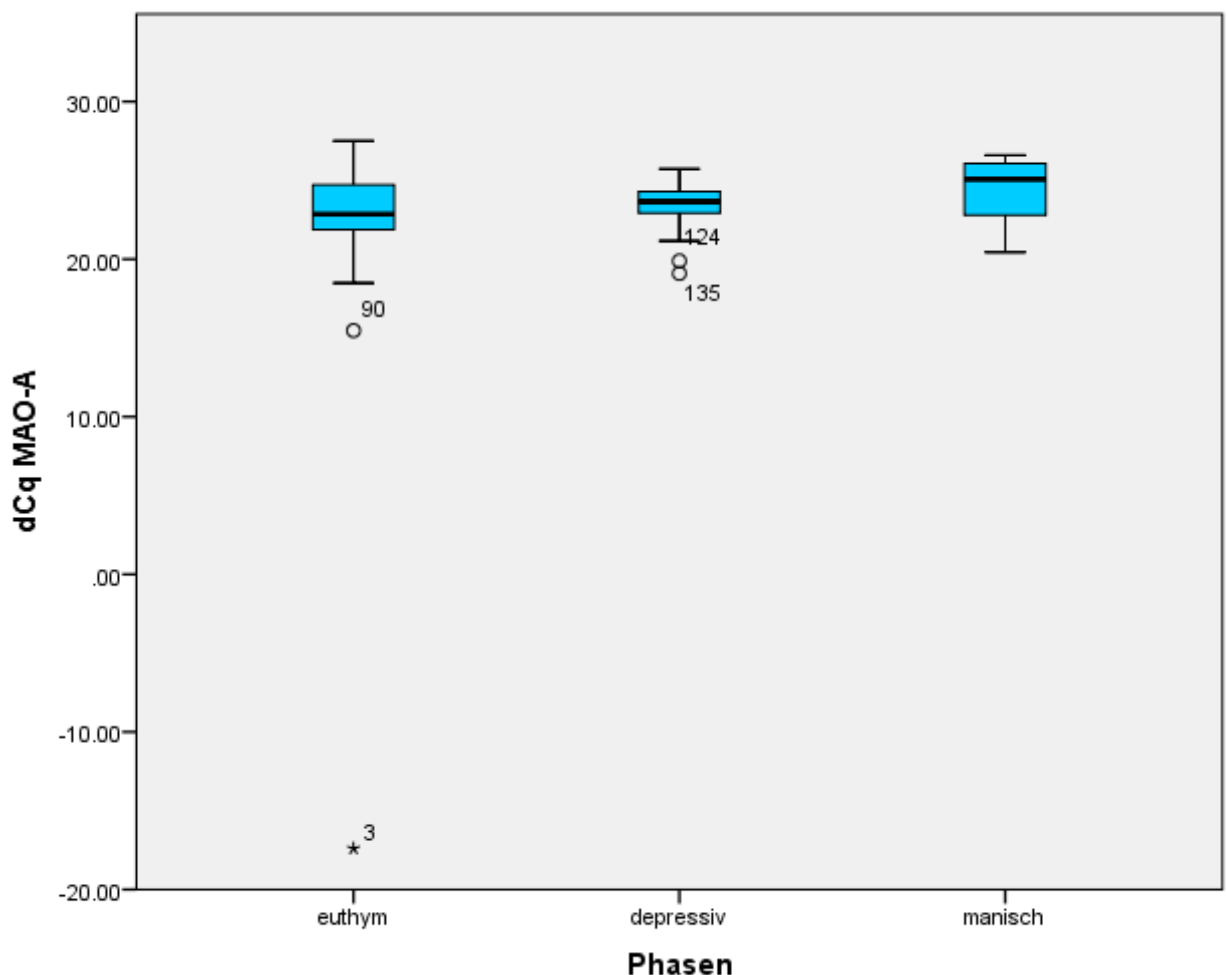
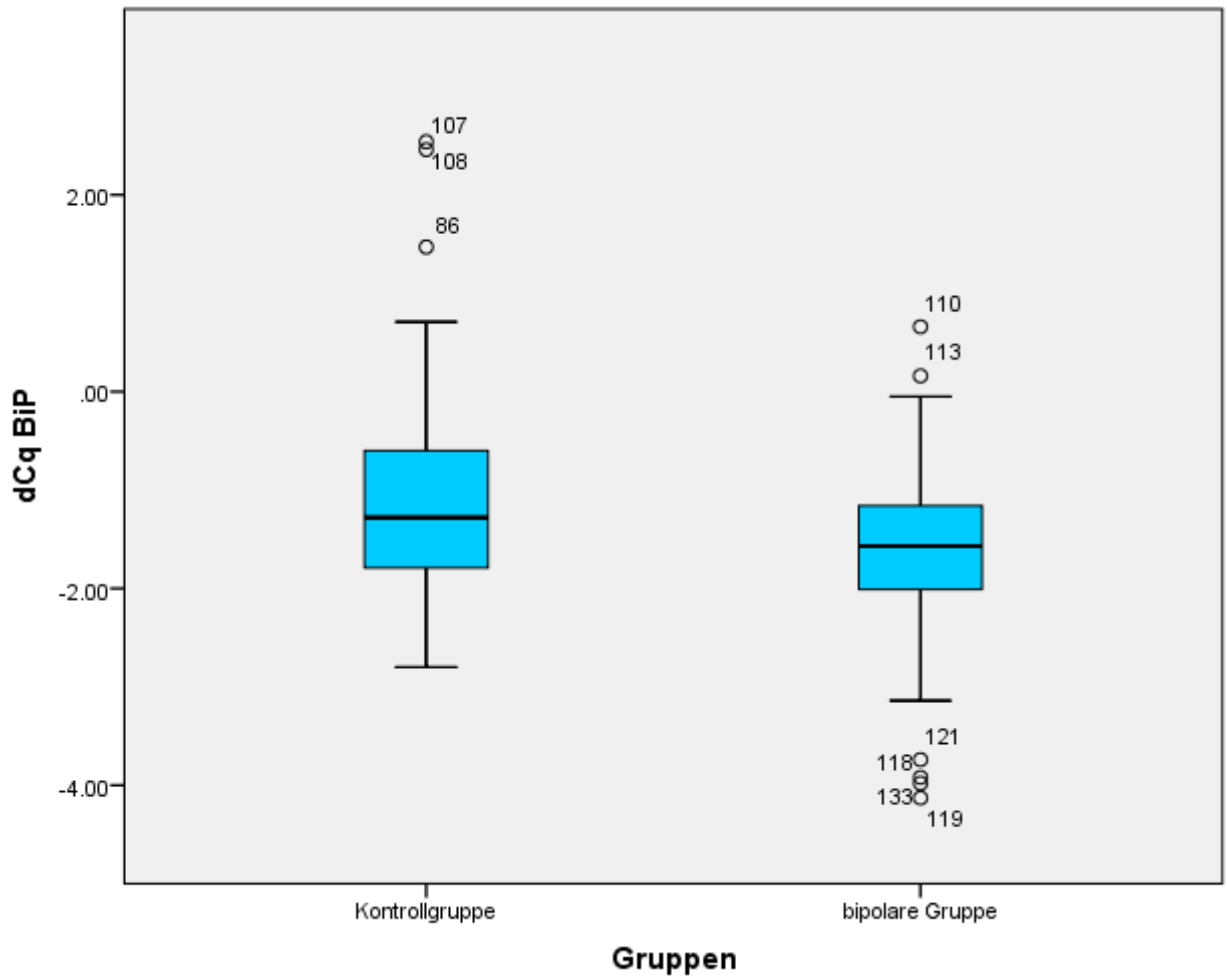


Abbildung 3-4 Boxplot der Genexpression von *MAO-A*. Unterteilung der BD-Gruppe in eine euthyme, depressive sowie manische Gruppe. Die Genexpression von *MAO-A* zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen BD-PatientInnen in affektiven Phasen und BD-PatientInnen in einer euthymen Phase ( $p = .32$ ).

Die durchgeführte ANCOVA konnte keinen signifikanten Unterschied der Genexpression von *MAO-A* zwischen den drei Gruppen nachweisen ( $F(2/79) = 1.16$ ,  $p = .32$ ). Der Median der dCq-Werte der euthymen Gruppe ( $n = 46$ ) betrug 22.86, jener der depressiven Gruppe ( $n = 23$ ) 23.66 und jener der manischen Gruppe ( $n = 10$ ) 25.07. Der Kruskal-Wallis-Mediantest bei unabhängigen Stichproben war ebenfalls nicht signifikant ( $\chi^2(2) = 2.87$ ,  $p = .24$ ). Demnach unterschieden sich BD-PatientInnen in einer affektiven Phase nicht von BD-PatientInnen in einer euthymen Phase.

### **3.3 Hypothese 2 „Bei BD kommt es zu einer signifikant erhöhten Expression von *BiP* im Vergleich zu gesunden Kontrollen“ und Hypothese 3 „Bei BD kommt es zu einer signifikant erniedrigten Expression von *CHOP* im Vergleich zu gesunden Kontrollen“**

Die Genexpression von *CHOP* wies eine Normalverteilung, aber keine Homogenität der Varianzen auf. Aus diesem Grund wurde der nicht parametrische Mann-Whitney-U-Test gewählt. Die Genexpression von *BiP* wies keine Normalverteilung auf, verfügte aber über homogene Varianzen. Die ANCOVA wurde zur Analyse der Daten verwendet. Zusätzlich wurde Mann-Whitney-U-Test angewandt.



**Abbildung 3-5** Boxplot der Genexpression von *BiP*. Die Genexpression von *BiP* zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen Individuen mit BD und Kontrollen ( $p = .01$ ).

Die ANCOVA zeigte einen signifikanten Unterschied der *BiP*-Genexpression zwischen der BD- und der Kontrollgruppe ( $F(1/128) = 10.08$ ,  $p = .01$ ). Relativiert zum Referenzgen *HPRT1* hatten BD-PatientInnen einen Median von -1.57 der dCq-Werte von *BiP*, die Kontrollgruppe -1.28. Der zusätzlich durchgeführte Mann-Whitney-U-Test zeigte ebenfalls einen signifikanten Unterschied der Genexpression von *BiP* zwischen der BD-Gruppe (mittlerer Rang = 60.40,  $n = 81$ ) und der Kontrollgruppe (mittlerer Rang = 79.40,  $n = 54$ ), (Mann-Whitney  $U = 1571.5$ ,  $z = -2.77$ ,  $p = .01$ , 2-seitig). Die Genexpression von *BiP* zeigt demnach einen signifikanten Unterschied zwischen Individuen mit BD und Kontrollen.

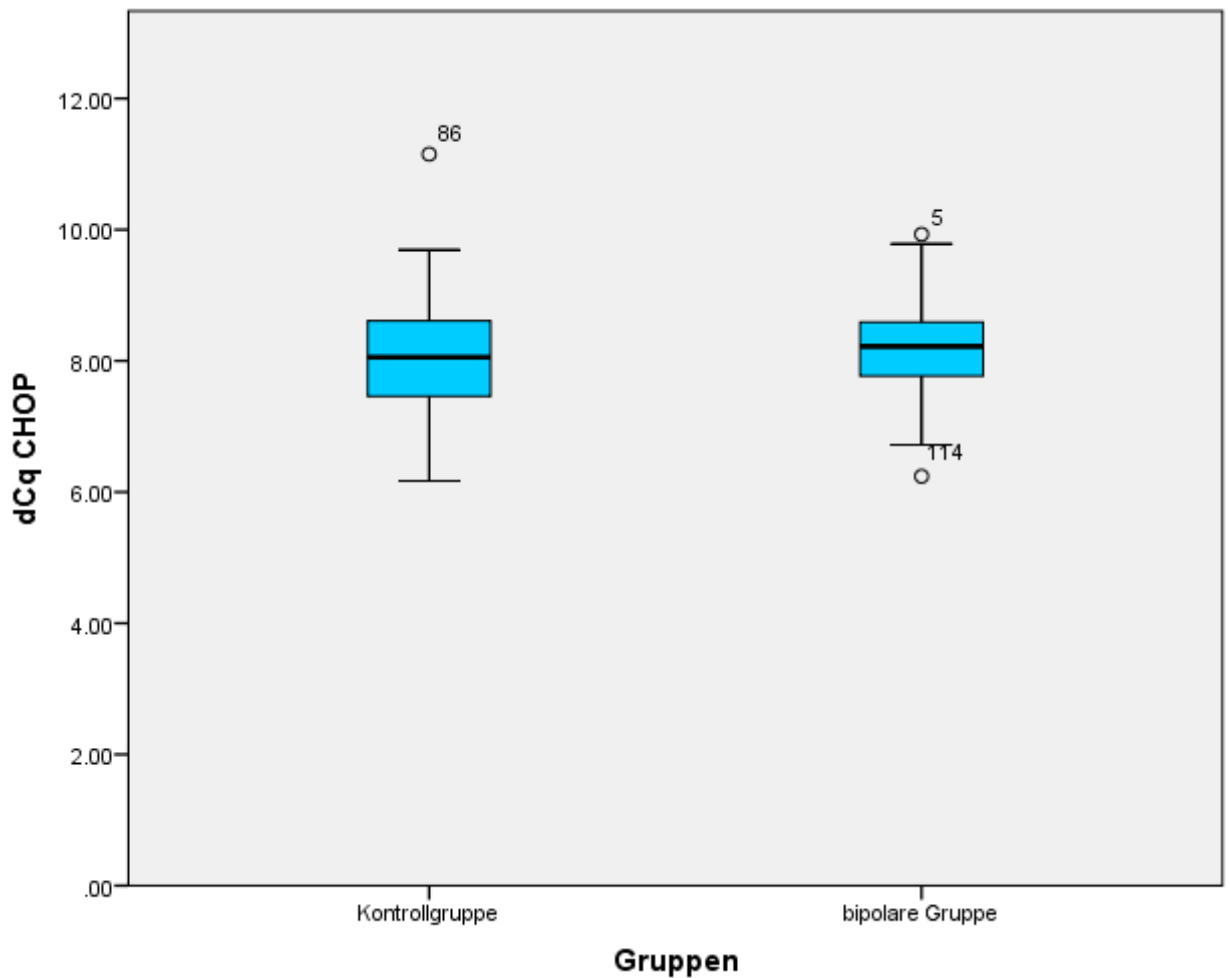


Abbildung 3-6 Boxplot der Genexpression von *CHOP*. Die Genexpression von *CHOP* zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Individuen mit BD und Kontrollen ( $p = .29$ ).

Der Mann-Whitney-U-Test zeigte keinen signifikanten Unterschied bezüglich der dCq-Werte von *CHOP* zwischen der BD-Gruppe (mittlerer Rang = 70.88,  $n = 81$ ) und der Kontrollgruppe (mittlerer Rang = 63.68,  $n = 54$ ), (Mann-Whitney  $U = 1953.5$ ,  $z = -1.05$ ,  $p = .29$ , 2-seitig). Relativiert zum Referenzgen *HPRT1* hatten BD-PatientInnen einen dCq-Mittelwert von *CHOP* von  $8.19 \pm 0.68$ , die Kontrollgruppe von  $8.05 \pm 0.94$ . Die zusätzlich durchgeführte ANCOVA zeigte ebenfalls kein signifikantes Ergebnis ( $F(1/128) = 0.39$ ,  $p = .54$ ). Demnach zeigte die Genexpression von *CHOP* keinen signifikanten Unterschied zwischen Individuen mit BD und Kontrollen.

### 3.3.1 Hypothese 2a „In affektiven Phasen der BD kommt es zu einer signifikant erhöhten Expression von *BiP* im Vergleich zur euthymen Phase“ und Hypothese 3a „In affektiven Phasen der BD kommt es zu einer signifikant erhöhten Expression von *CHOP* im Vergleich zur euthymen Phase“

*CHOP* und *BiP* waren beide normalverteilt. Zudem lagen homogene Varianzen vor. Zur Analyse der Genexpression der verschiedenen Phasen der BD wurde aus diesem Grund eine ANCOVA angewandt.

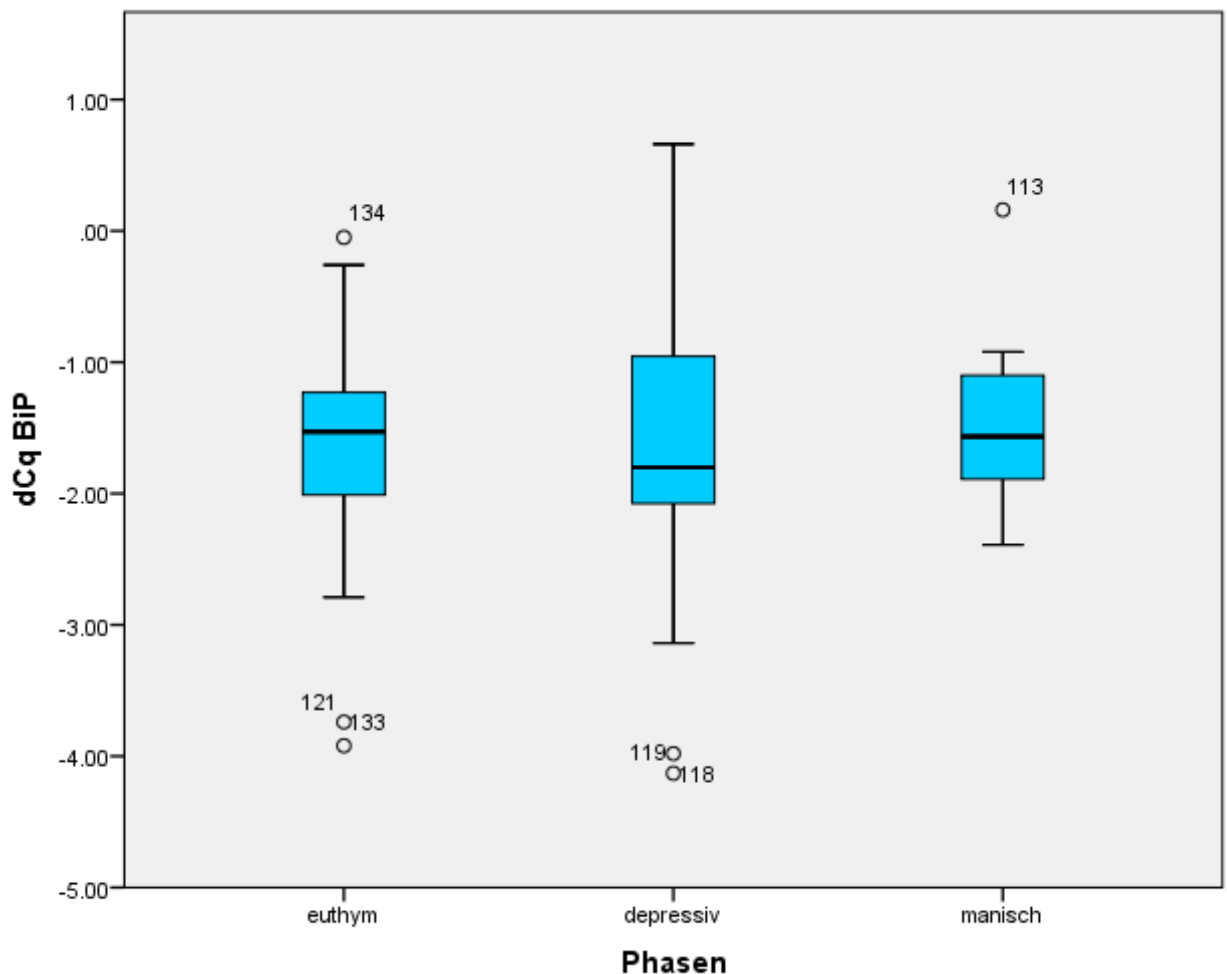


Abbildung 3-7 Boxplot der Genexpression von *BiP*. Unterteilung der BD-Gruppe in eine euthyme, depressive sowie manische Gruppe. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen affektiven und euthymen Phasen der BD erkennbar ( $p = .78$ ).

Die Genexpression von *BiP* zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Gruppen. Die ANCOVA ist nicht signifikant ( $F(2/79) = .26$ ,  $p = .78$ ). Die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der dCq-Werte von *BiP* betragen in der euthymen Gruppe ( $n = 46$ )  $-1.62 \pm 0.72$ , in der depressiven Gruppe ( $n = 23$ )  $-1.69$

$\pm 1.13$  und in der manischen Gruppe ( $n = 10$ )  $-1.45 \pm 0.72$ . Demnach war kein signifikanter Unterschied der *BiP*-Genexpression zwischen affektiven und euthymen Phasen der BD erkennbar.

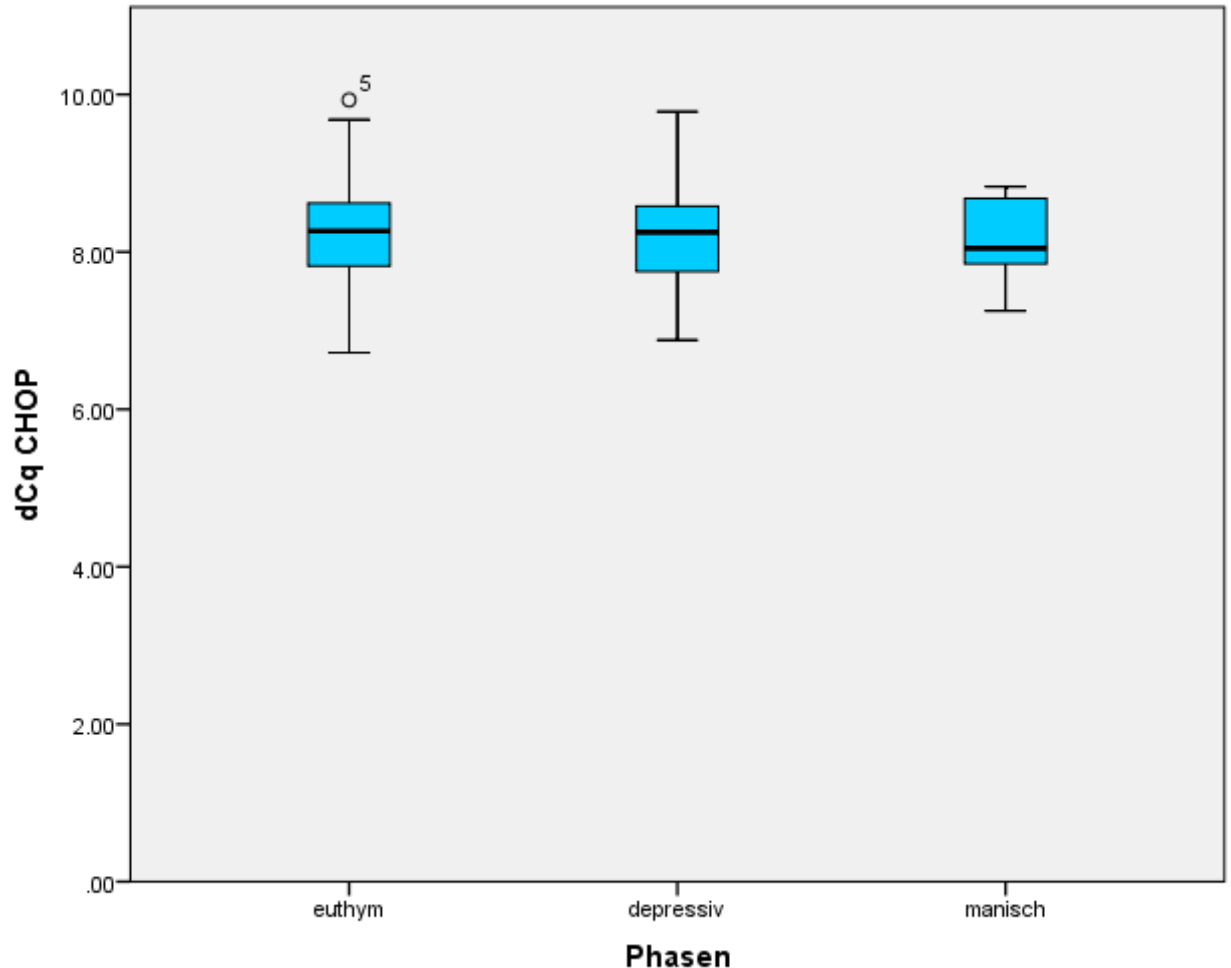


Abbildung 3-8 Boxplot der Genexpression von *CHOP*. Unterteilung der BD-Gruppe in eine euthyme, depressive sowie manische Gruppe. Die Genexpression von *CHOP* zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den affektiven Phasen (depressive Phase, manische Phase) und der euthymen Phase der BD ( $p = .80$ ).

Die ANCOVA zeigte kein signifikantes Ergebnis der *CHOP*-Genexpression zwischen affektiven Phasen und euthymen Phasen ( $F(2/79) = .22$ ,  $p = .80$ ). Die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der dCq-Werte von *CHOP* betragen in der euthymen Gruppe ( $n = 46$ )  $8.25 \pm 0.69$ , in der depressiven Gruppe ( $n = 23$ )  $8.22 \pm 0.62$  und in der manischen Gruppe ( $n = 10$ )  $8.14 \pm 0.51$ . Die Genexpression von *CHOP* zeigte demnach keinen signifikanten Unterschied zwischen den affektiven Phasen der BD und der euthymen Phase.

### 3.4 Korrelation

Die Parameter *ARNTL*, *MAO-A*, *BiP* und *CHOP* wurden mittels dem Spearman-Korrelationskoeffizient für nicht parametrische Daten auf einen Zusammenhang geprüft. Es zeigte sich ein mittelstarker positiver Zusammenhang zwischen der Genexpression von *ARNTL* und *MAO-A*, der sich als signifikant herausstellte ( $r_{sp} = 0.708$ ,  $p < .001$ ). Das Streudiagramm veranschaulicht die Korrelation.

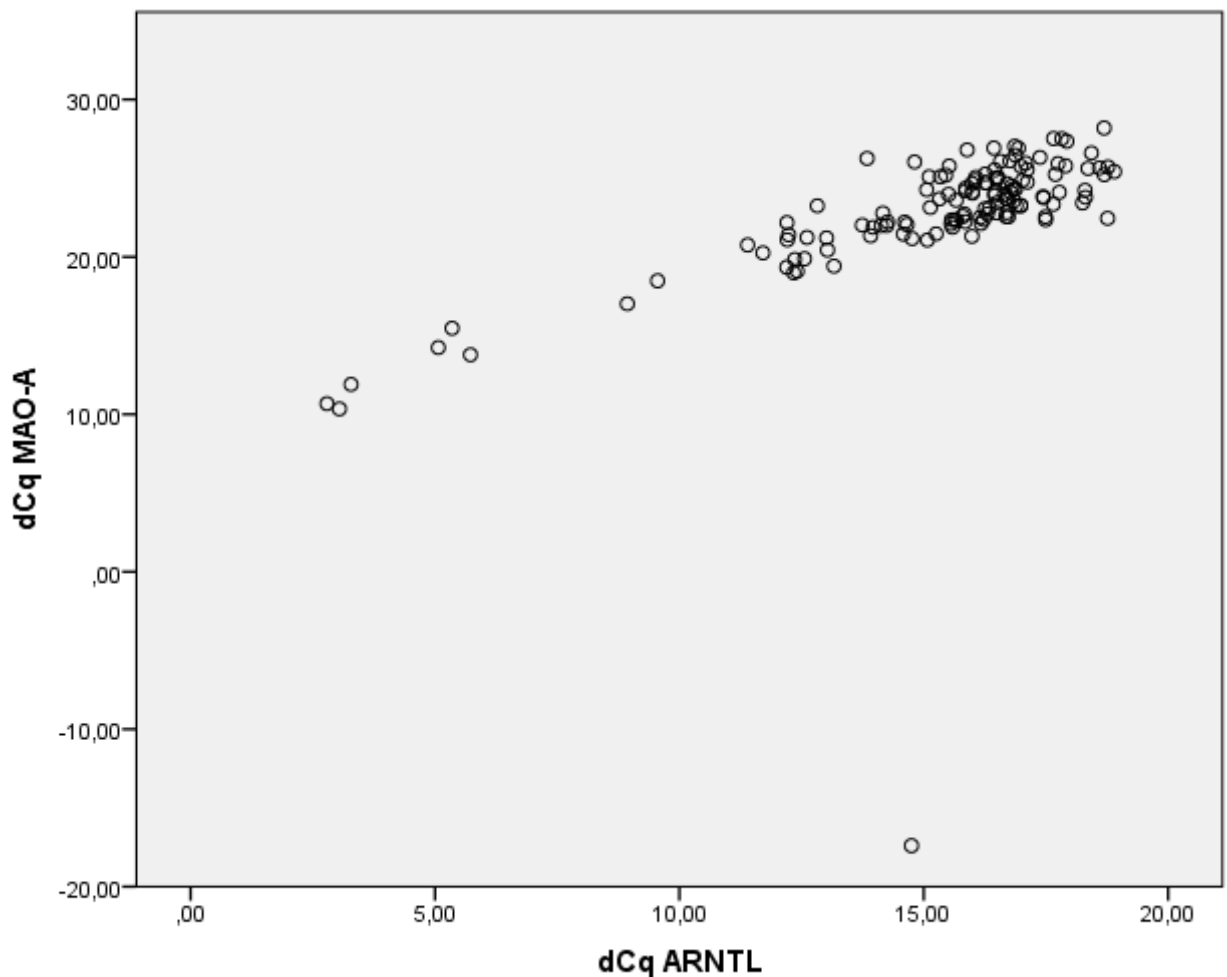


Abbildung 3-9 Streudiagramm der Genexpression von *ARNTL* und *MAO-A* ( $r_{sp} = 0.708$ ,  $p < .001$ ). Ein linearer Zusammenhang ist erkennbar.

Weiters zeigte sich ein schwacher positiver Zusammenhang zwischen der Genexpression von *ARNTL* und *BiP*, der sich als signifikant herausstellte ( $r_{sp} = 0.207$ ,  $p = .02$ ). Das Streudiagramm veranschaulicht die Korrelation.

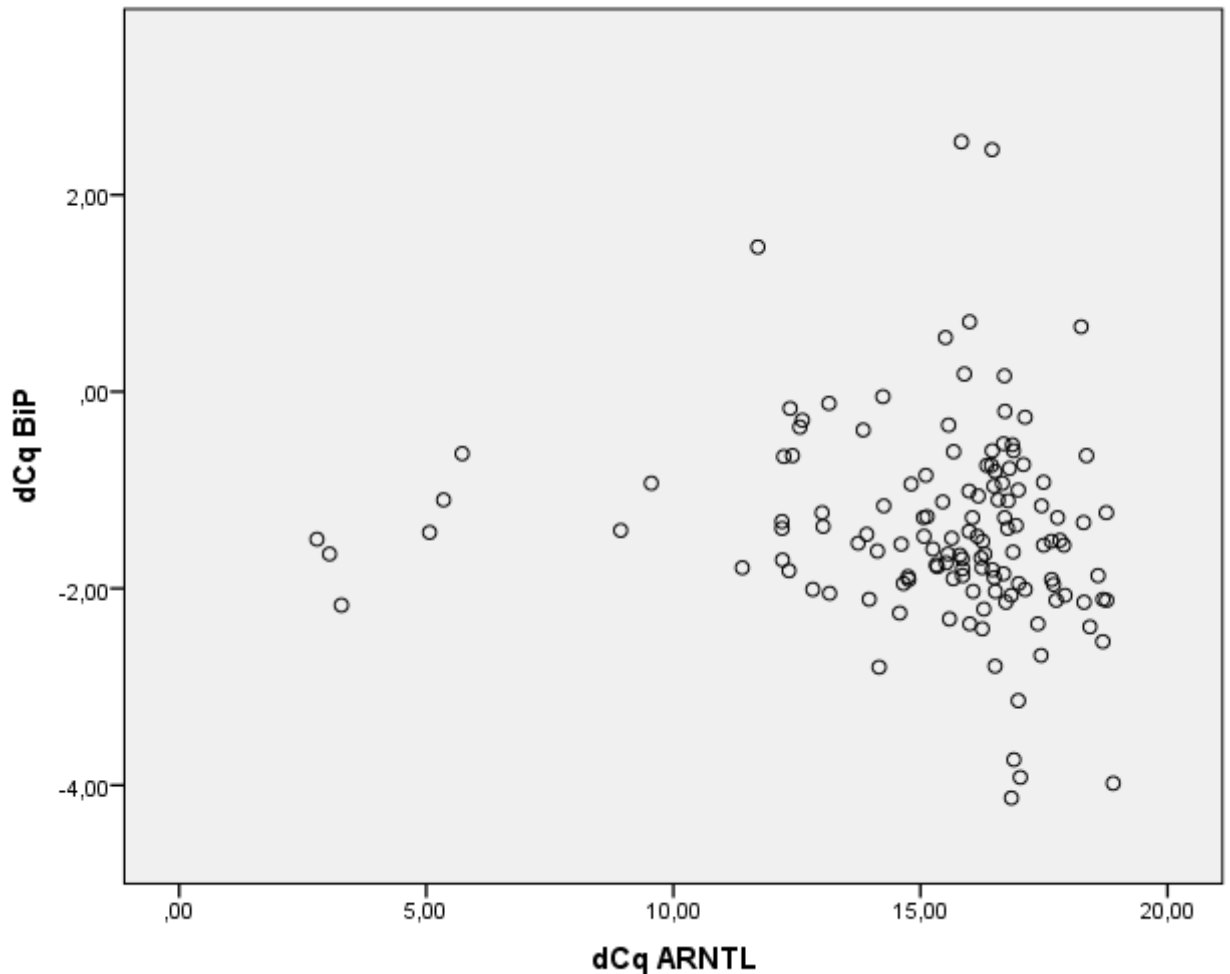


Abbildung 3-10 Streudiagramm der Genexpression von *ARNTL* und *BiP* ( $r_{sp} = 0.207$ ,  $p = .02$ ).

Zwischen den übrigen Parametern konnte kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich ein signifikanter Unterschied der *BiP*-Genexpression zwischen der BD- und Kontrollgruppe abgebildet hat. Außerdem zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Genexpression von *ARNTL* zwischen der euthymen und depressiven Gruppe. Des Weiteren bestand eine mittelstarke Korrelation zwischen *ARNTL* und *MAO-A* sowie eine schwache Korrelation zwischen *ARNTL* und *BiP*. Die Nullhypothesen konnten gegen die Erwartungen bei den anderen Fragestellungen nicht verworfen werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Ergebnisse

Ein veränderter circadianer Rhythmus bei BD gilt als gesichert. Es ist jedoch fraglich, welche Mechanismen diese Veränderung bewirken. In dieser Studie wurden *ARNTL*, *MAO-A*, *BiP* und *CHOP* mittels qPCR untersucht und ihre Genexpression zwischen BD-PatientInnen und einer Kontrollgruppe, ebenso wie Unterschiede zwischen depressiven, manischen Phasen und der euthymen Phase innerhalb der Gruppe der BD, verglichen.

Gegen die Erwartungen konnte jedoch die Nullhypothese der Hypothese 1 „Bei BD kommt es zu einer signifikant erniedrigten Expression von *ARNTL* und *MAO-A* im Vergleich zu gesunden Kontrollen“ nicht verworfen werden. Sowohl die Genexpression von *ARNTL* als auch von *MAO-A* waren gleichmäßig über die Gruppen verteilt. Etliche Studien weisen auf eine genetische Veränderung von *ARNTL* bei BD hin (Dmitrzak-Weglarz et al. 2015; McCarthy et al. 2012; Leniculescu et al. 2008; Nievergelt et al. 2006). Es gibt allerdings nur wenige Studien, welche die Expression von *ARNTL* quantitativ untersuchen. Yang et al. analysierten die *ARNTL*-Expression quantitativ in Fibroblasten und konnten lediglich einen Trend für eine verringerte Expression nachweisen (Yang et al. 2009). Nakatani et al. hingegen fanden eine erhöhte *ARNTL*-Expression in post mortem entnommenen Gehirnproben von Bipolar-I-Erkrankten (Nakatani et al. 2006). Möglicherweise stehen andere Uhrengene für einen veränderten circadianen Rhythmus bei BD im Vordergrund (Roybal et al. 2007; Sjöholm et al. 2010; Rocha et al. 2017). Höchstwahrscheinlich handelt es sich aber um eine Kombination aus Fehlfunktionen mehrerer Uhrengene. Neben einer Veränderung der Uhrengene an sich kann auch eine veränderte Informationsübertragung des Lichtstandes an die Uhrengene für eine Veränderung des circadianen Rhythmus verantwortlich sein. Zudem ist eine Veränderung der CCG möglich und könnte die circadianen Rhythmusveränderungen erklären. Alternativ ist in Betracht zu ziehen, dass Mechanismen, die die molekulare Uhr beeinflussen, zu einer Veränderung dieser führen. Beispielsweise bewirkt eine Veränderung des ER-Kalziums eine

Veränderung der circadianen Uhr (Pluquet et al. 2014). Zu beachten ist auch, dass Querschnittsstudien, gerade bei sich schnell wandelnden Prozessen wie im Falle der molekularen Uhr, eine geringere Wahrscheinlichkeit haben, die gewünschten Endpunkte bei der Probenentnahme anzutreffen als Längsstudien, im Zuge derer mehrere Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgen. Weitere Limitationen und Stärken der vorliegenden Studie werden in Absatz 4.2 „Limitationen und Stärken der Studie“ angeführt. Bei der Analyse der Hypothese 1a *„In affektiven Phasen der BD kommt es zu einer signifikant erniedrigten Expression von ARNTL und MAO-A im Vergleich zur euthymen Phase“* zeigten sich signifikant erhöhte dCq-Werte der *ARNTL*-Expression von BD-PatientInnen in einer depressiven Phase im Vergleich zu der euthymen Phase. Erhöhte dCq-Werte stehen für eine erniedrigte *ARNTL*-Expression. Dies ist nicht mit dem Modell im Einklang, bei dem eine erhöhte *ARNTL*-Expression in der depressiven Phase angenommen wurde. Die vermehrte *ARNTL*-Expression führt laut diesem Modell wiederum zu einer erhöhten *MAO-A*-Expression. Auf diese Weise kommt es zu einem vermehrten Abbau der Neurotransmitter (Dopamin, Serotonin, Noradrenalin, Adrenalin) und folglich zu einer gedrückten Stimmungslage. Die Genexpression von *MAO-A* zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Phasen der BD.

Da *MAO-A* sowohl durch das *ARNTL-NPAS2/CLOCK*-Heterodimer als auch durch *PER2* aktiviert wird, wurde eine veränderte *MAO-A*-Expression bei BD-PatientInnen im Vergleich zu gesunden Kontrollen angenommen (Kripke et al. 2009). Es konnte allerdings bei dieser Studie kein signifikanter Unterschied zwischen BD-ProbandInnen und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Möglicherweise sind epigenetische Veränderungen von *MAO-A*, durch welche dessen Expression unterdrückt wird, ausschlaggebend.

Bei der Untersuchung der beiden ER-Stressparameter *BiP* und *CHOP* konnte in der vorliegenden Studie ein signifikanter Unterschied der *BiP*-Expression zwischen der BD- und der Kontrollgruppe gezeigt werden. Bei der 2. Hypothese *„Bei BD kommt es zu einer signifikant erhöhten Expression von BiP im Vergleich zu gesunden Kontrollen“* wurde die Nullhypothese somit als verworfen angenommen. Die dCq-Werte von *BiP* waren in der BD-Gruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Dies spricht für eine vermehrte Expression von

*BiP* bei BD, da sich die dCq-Werte invers zur Genexpression verhalten. Bei der Hypothese 2a „In affektiven Phasen der BD kommt es zu einer signifikant erhöhten Expression von *BiP* im Vergleich zur euthymen Phase“ zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Phasen der BD und der Kontrollgruppe. Die Nullhypothese konnte nicht verworfen werden. Entgegen der Erwartungen konnte die Nullhypothese der Hypothese 3 „Bei BD kommt es zu einer signifikant erniedrigten Expression von *CHOP* im Vergleich zu gesunden Kontrollen“ und 3a „In affektiven Phasen der BD kommt es zu einer signifikant erhöhten Expression von *CHOP* im Vergleich zur euthymen Phase“ nicht verworfen werden.

Vorhergegangene Studien zeigten, dass es nach ER-Stressinduktion zu einer verringerten *BiP*- und *CHOP*-Expression bei BD-ProbandInnen kommt (Pfaffenseller et al. 2014; So et al. 2007; Kakiuchi et al. 2003). Ohne ER-Stressinduktion zeigte sich eine erhöhte *BiP*-Genexpression und kein signifikanter Unterschied der *CHOP*-Expression zwischen der BD- und Kontrollgruppe (Bengesser 2016). Das Ergebnis von Bengesser (2016) wurde von dieser Diplomarbeit bestätigt. Dies könnte dafür sprechen, dass BD-PatientInnen basal eine erhöhte *BiP*-Expression aufweisen, da sie einer andauernden ER-Stressreaktion ausgesetzt sind. Durch diese Überbelastung der UPR kommt es bei einer induzierten ER-Stressreaktion zu einer geringeren UPR-Antwort als bei der Kontrollgruppe. Sie sind nach dieser Theorie sowohl in ihrer basalen Expression als auch nach ER-Stressinduktion, durch vermehrten andauernden ER-Stress und/oder eine inadäquate ER-Stressreaktion, vermehrt durch die Anstauung fehlgefalteter Proteine betroffen. Mehrere Studien fanden einen positiv regulatorischen Effekt von Lithium und Valproat auf *BiP* (Kakiuchi et al. 2009; Chen et al. 2000; Shao et al. 2005). Dies könnte eine Erhöhung der *BiP*-Expression bei BD-PatientInnen unter medikamentöser Therapie erklären. Valproat unterdrückt außerdem das proapoptotische *CHOP*, was den fehlenden Anstieg der *CHOP*-Expression ohne ER-Stressinduktion trotz einer Erhöhung der *BiP*-Expression bei BD-PatientInnen erklären könnte (Li et al. 2017). Sowohl Lithium als auch Valproat wurden allerdings bei der durchgeführten ANCOVA als Kovariaten berücksichtigt und zeigten keinen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis. Ein weiterer Grund für eine Erhöhung der *BiP*-Expression könnte eine Erhöhung des Leptinspiegels bei adipösen ProbandInnen sein. ER-Stress führt zu

einer Leptinresistenz und ist somit an der Entstehung einer Adipositas beteiligt, da Leptin nicht mehr in ausreichendem Maße den Appetit zügeln kann (Ozcan et al. 2009). Bei einer Leptinresistenz steigt der Leptinspiegel im Blut folglich an. ER-Stress wiederum tritt durch Übergewicht vermehrt auf. Interessanterweise fanden Thon et al. 2014 eine hochregulierte *BiP*-Expression durch Leptin, die protektiv bei adipositasassoziiertem ER-Stress wirkt (Thon et al. 2014). Bei der durchgeführten ANCOVA wurde allerdings auch der BMI der PatientInnen miteinbezogen, wodurch ein anderer Mechanismus der *BiP*-Expressionserhöhung angenommen werden kann. Des Weiteren ist anzumerken, dass die *CHOP*-Expression trotz einer erhöhten *BiP*-Expression, also einem vermehrten Auftreten von ER-Stress, in dieser Studie nicht erhöht war. Pfaffenseller et al. fanden trotz einer verringerten *CHOP*-Expression ein vermehrtes Zellsterben in der BD-Gruppe vor. Dies kann durch zusätzliche Wege, die zur Apoptose führen, erklärt werden und spiegelt eine inadäquate Reaktion auf ER-Stress wider. Da sowohl *BiP* als auch *CHOP* nach ER-Stressinduktion beeinträchtigt sind, spricht dies für eine verringerte ER-Stressreaktion bei BD (Pfaffenseller et al. 2014). Es gilt zu ergründen, welche Mechanismen zur Unterdrückung von *BiP* und *CHOP* nach ER-Stressinduktion als auch zu einer Erhöhung der basalen *BiP*-Expression bei BD im Vergleich zu gesunden Kontrollen ohne ER-Stressinduktion führt.

Bei der Fragestellung der 4. Hypothese „*ER-Stressmarker korrelieren mit der Genexpression von ARNTL und MAO-A*“, zeigte sich ein mittelstarker Zusammenhang zwischen *ARNTL* und *MAO-A*. Dies ist mit den Publikationen von Kripke et al. (2009) sowie Hampp et al. (2008) im Einklang, die eine Aktivierung von *MAO-A* durch das *ARNTL-NPAS2*-Heterodimer und das *CLOCK-ARNTL*-Heterodimer beschreiben (Kripke et al. 2009; Hampp et al. 2008). Des Weiteren zeigte sich ein schwacher positiver Zusammenhang zwischen der Genexpression von *ARNTL* und *BiP*, der sich als signifikant herausstellte. Aufgrund der schwachen Ausprägung der Korrelation sind weitere Studien nötig, die diese Fragestellung behandeln. Vorstudien, die eine Korrelation der Expression von *ARNTL* und *BiP* nachweisen, sind nicht vorhanden. Ein Zusammenhang zwischen dem ER-Stress und dem circadianen Rhythmus wird jedoch angenommen. So zeigte sich sowohl eine Regulierung der circadianen Uhr durch ER-Kalzium als auch eine circadiane Regulierung des ER-Kalziums durch Uhrengene (Ikeda et al.

2003; Báez-Ruiz & Díaz-Muñoz 2011; O'Neill & Reddy 2012; Pluquet et al. 2014). Außerdem wurde eine Regulierung der Expression mehrerer Uhrgene durch UPR-Gene und umgekehrt, eine rhythmische Beeinflussung UPR-spezifischer Gene durch Uhrgene, nachgewiesen (Koyanagi et al. 2011; Pluquet et al. 2013; Pluquet et al. 2014; Cretenet et al. 2010). Interessanterweise zeigte *BiP* eine robuste rhythmische Expression in verschiedenen Geweben wie der Leber, den Nieren und dem Herz (Hughes et al. 2009). Dies spricht für eine Beeinflussung der *BiP*-Expression durch Uhrgene und steht somit in Einklang mit der in dieser Studie nachgewiesenen schwachen Korrelation von *ARNTL* und *BiP*.

#### **4.2 Limitationen und Stärken der Studie**

Dieser Abschnitt soll Limitationen der vorliegenden Studie aufzeigen sowie Durchführungsratschläge für zukünftige Folgestudien liefern.

Es ist fraglich, ob Ergebnisse von Genanalysen aus peripherem Blut von ProbandInnen repräsentativ für die Verhältnisse im Gehirn sein können. Tsuang et al. untersuchten diese Fragestellung und kamen zu dem Schluss, dass isolierte RNA aus dem Blut für diagnostische Versuche verwendet werden kann. Blut ermöglicht gegenüber Gehirngewebsproben eine größere Fallzahl und spiegelt vermutlich die Verhältnisse im Gehirn zureichend wider (Tsuang et al. 2005). Es wird demnach angenommen, dass ER-stressspezifische Veränderungen im peripheren Blut das Verhältnis im ZNS repräsentieren (Pfaffenseller et al. 2014). Es gibt nur eine geringe Anzahl an in-vivo Studien. Bown et al. (2000) untersuchten die ER-Stressproteinexpression post mortem an PatientInnen, die Suizid begangen hatten. In depressiven Individuen konnte eine Erhöhung der *BiP*-Expression im temporalen Cortex nachgewiesen werden, nicht aber bei BD oder Schizophrenie (Bown et al. 2000). Eine zusätzliche Schwierigkeit bei der ER-Stressanalyse ist eine etwaige kurzlebige Ausprägung des ER-Stress, die durch Querschnittsstudien schwer erfassbar ist.

Die isolierte RNA aus dem peripheren Blut wurde anschließend dem Standard entsprechend in cDNA umgewandelt. Mit der stabileren cDNA ist eine qPCR im Gegensatz zur RNA möglich, da die cDNA hitzeunempfindlicher ist. Diese Methode ist der Goldstandard zur quantitativen RNA-Analyse (Jung et al. 2013).

Andere Methoden, wie beispielsweise der Northern Blot, stoßen bei der Analyse geringer RNA-Mengen an ihre Grenzen, da keine Vervielfältigung der Zielsequenz wie im Falle der qPCR stattfindet (Thiemann et al. 2015).

Es ist vorteilhaft, bei der qPCR Gene zu untersuchen, die auch tatsächlich aktiv sind. Im Gegensatz zur genomischen DNA besteht mRNA natürlicherweise nur aus Exons. Auf diese Weise ist es möglich, auf die Aktivität der einzelnen Gene rückzuschließen. Kommt es beispielsweise zu keiner mRNA-Bildung, sind die gesuchten Gene nicht aktiv. Ihre Information dient zu dem Zeitpunkt nicht als Vorlage für die Proteinsynthese. Nach diesem Prinzip ist es ebenfalls möglich zu analysieren, welche Umweltfaktoren zur Expression verschiedener Gene führen (Clark 2006). Um einer Verunreinigung mit genomischer DNA entgegenzuwirken, sollte das Amplikon mindestens ein Intron überspannen. Auf diese Weise ist es möglich, eine Amplifikation genomischer DNA auszuschließen, da das Amplikon sonst erheblich größer und somit als Nebenprodukt ersichtlich wäre. In vielen Fällen kommt es durch die erhöhte Größe zu gar keiner Amplifikation (Dale et al. 2012). Bei der vorliegenden Diplomarbeit wurde auf ein derartiges Amplikon-Design zurückgegriffen.

Die Wahl der TaqMan®-Methode für die Analyse der Genexpression von *ARNTL* und *MAO-A* und der SYBR® Green-Methode bei *BiP* und *CHOP* beruht auf Vorstudien mit den jeweiligen Methoden.

Die Kovariaten wurden mittels Literaturrecherche ermittelt. Diese wurden sowohl deskriptiv als auch graphisch geprüft. Unterschiede zwischen den Kohorten sind in Kapitel 3.1. „Kohortenbeschreibung“ angeführt und wurden bei der statistischen Auswertung berücksichtigt. Da der BMI zwischen BD-PatientInnen und der Kontrollgruppe einen signifikanten Unterschied aufwies, wurde er bei der ANCOVA berücksichtigt. Eine weitere Limitation dieser Studie ist das nicht erhobene Schlafverhalten der ProbandInnen. Etwaige Auswirkungen des Schlafverhaltens auf das Uhrengen *ARNTL* fließen demnach nicht in die statistische Analyse ein. Weiters wurden keine Daten zur Lichtexposition erhoben. Da Licht den primären Zeitgeber darstellt, können verschiedene Lichtexpositionsdauern auch zu unterschiedlichen Expressionsmustern der Uhrengene führen.

Bei der statistischen Analyse wurde, um auch die Kovariaten zu berücksichtigen, das robuste Verfahren der ANCOVA auch bei nicht parametrischer Verteilung

durchgeführt. Parametrische Tests, wie die ANCOVA, sind ab einer Gruppengröße von  $n = 30$  nach dem zentralen Grenzwerttheorem selbst bei nicht gegebener Normalverteilung stabil. Die Aussagekraft parametrischer Tests liegt über derer von nicht parametrischen Tests. Bei der statistischen Analyse der Gruppenunterschiede zwischen den einzelnen Phasen der BD wies die euthyme Gruppe der *ARNTL*- und *MAO-A*-Expression keine Normalverteilung auf, verfügte aber über eine ProbandInnenanzahl von  $n > 30$ . Die PatientInnenanzahl in einer depressiven oder manischen Phase war zwar gering, aber normalverteilt. Dies ist auch eine weitere Schwäche der vorliegenden Studie: Möglicherweise ist die PatientInnenanzahl, die sich in einer manischen Phase befanden, zu gering um einen signifikanten Effekt nachzuweisen.

Des Weiteren ist zu beachten, dass es sich bei der vorliegenden Diplomarbeit um eine Querschnittsstudie handelt. Folgestudien mit mehreren Messpunkten sind nötig, um die Ergebnisse zu verifizieren. Auch die Epigenetik ist nicht zu vernachlässigen und bietet Raum für eventuelle Nachfolgestudien.

Eine Stärke der Studie ist, dass fortlaufend Daten gesammelt werden und für spätere Analysen mit einem größeren ProbandInnenkollektiv verwendet werden können. Da aus den gesammelten Daten jeweils mehrere Fragestellungen bearbeitet werden, kann auf viele Parameter zurückgegriffen werden. Auch retrospektive Studien können durchgeführt werden. Da die Rekrutierung vieler PatientInnen in einer affektiven Phase mit einem hohen Zeitaufwand verbunden ist, ist eine Studie auf einen längeren Zeitraum anzulegen. Im Vergleich zu anderen Studien verfügte die vorliegende Studie über eine höhere Fallzahl an zum Zeitpunkt der Blutentnahme affektiven ProbandInnen. Möglicherweise ist aber eine noch höhere Fallzahl nötig, um ein signifikantes Ergebnis nachweisen zu können.

Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass es bis dato nicht viele vergleichbare Studien gibt und diese Diplomarbeit somit als Vorlage für weitere Studien dieser Art dienen kann. Außerdem stellt sie eine Vergleichsmöglichkeit für die wenigen ähnlichen Studiendesigns dar. Genexpressionsstudien im peripheren Blut von PatientInnen sind wichtig, um eventuell Biomarker für affektive Phasen der BD im Blut bestimmen zu können. Bisher sind keine solcher Blutmarker bekannt.

### 4.3 Konklusion

Diese Diplomarbeit untersuchte die molekulare Uhr und den ER-Stress bei BD. Es zeigte sich eine erhöhte *BiP*-Expression von BD-PatientInnen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis wird von Bengesser 2016 (Bengesser 2016) und einer weiteren, sich gerade im Publikationsprozess befindlichen Studie (Bengesser et al. 2018), unterstützt. Da Studien ohne ER-Stressinduktion rar sind, sind weitere Studien nötig um dieses Ergebnis zu verifizieren. Des Weiteren konnte eine signifikant erniedrigte *ARNTL*-Expression in depressiven Phasen im Vergleich zur euthymen Phase festgestellt werden. Dies ist nicht mit dem angenommenen Modell im Einklang, laut dem es in der Depression zu einer erhöhten *ARNTL*-Expression mit folglich erhöhter *MAO-A*-Expression kommen sollte. Die Expression von *MAO-A* unterschied sich nicht zwischen den einzelnen Phasen der BD. Da es sich bei der vorliegenden Studie um eine Querschnittsstudie handelt, sind weitere Longitudinalstudien mit größerer Fallzahl nötig, um dieses Ergebnis zu bestätigen. Außerdem konnte eine positive Korrelation zwischen *ARNTL* und *MAO-A* sowie eine schwache Korrelation zwischen *ARNTL* und *BiP* nachgewiesen werden. Die Korrelation zwischen *ARNTL* und *MAO-A* ist mit den Publikationen von Kripke et al. (2009) sowie Hampp et al. (2008) im Einklang, die eine Aktivierung von *MAO-A* durch das *ARNTL-NPAS2*-Heterodimer und das *CLOCK-ARNTL*-Heterodimer beschreiben (Kripke et al. 2009; Hampp et al. 2008). Die schwache Korrelation zwischen *ARNTL* und *BiP* kann durch eine Beeinflussung des ER durch Uhrengene erklärt werden. Eine rhythmische Expression von *BiP* spricht für einen vorhandenen Zusammenhang der *BiP*-Genexpression mit Uhrengenen (Hughes et al. 2009). Vorstudien bezüglich der Korrelation der Genexpression zwischen *ARNTL* und *BiP* fehlen. Diese Studie konnte keinen signifikanten Unterschied des Uhrengens *ARNTL* und *MAO-A* bei BD-PatientInnen im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen. Wie wichtig ein regelmäßiger Tagesrhythmus dennoch ist, wird in der Einleitung dieser Diplomarbeit durch eine Zusammenfassung der Literatur verdeutlicht. Für die Fragestellungen, ob sich die Expression von *MAO-A*, *BiP* und *CHOP* von BD-PatientInnen in affektiven Phasen von BD-PatientInnen in einer

euthymen Phase unterscheidet, ist möglicherweise ein größeres Sample notwendig und bietet Raum für eventuelle Nachfolgestudien. *ARNTL* könnte möglicherweise einen geeigneten Indikator im peripheren Blut von PatientInnen für affektive Phasen der BD darstellen.

Diese Diplomarbeit ermöglicht einen Einblick in die beiden Themen der Uhrengene und des ER-Stress und liefert neben signifikanten Ergebnissen eine Zusammenfassung der vorhandenen Literatur sowie eine genaue Beschreibung der angewandten Methoden für nachfolgende Studien. Bei einer Verifikation der Ergebnisse können in weiterer Folge eine Optimierung der medikamentösen Behandlung der BD oder eine neue Diagnosemethode entwickelt werden. In Folge ist es möglich, weitere Prozesse, die durch ER- oder uhrenspezifische Gene beeinflusst werden, auf eine Veränderung bei BD zu untersuchen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass beide in dieser Arbeit bearbeiteten Themengebiete von großer Bedeutung für die Pathogenese der BD sind und durch nachfolgende Studien genauer beleuchtet werden sollten.

## 5 Literaturverzeichnis

- Abrahamson, E.E. & Moore, R.Y., 2001. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: Retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Research*, 916(1–2), pp.172–191. Available at: [www.elsevier.com](http://www.elsevier.com) [Accessed June 7, 2017].
- Agostinelli, F. et al., 2016. What time is it? Deep learning approaches for circadian rhythms. *Bioinformatics*, 32(12), pp.i8–i17. Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC4908327/pdf/btw243.pdf> [Accessed June 12, 2017].
- American Psychiatric Association, 2000. Dsm-Iv-Tr. In *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th edition TR*. Washington: American Psychiatric Association, pp. 345–400.
- Angst, F. et al., 2002. Mortality of patients with mood disorders: follow-up over 34–38 years. *Journal of Affective Disorders*, 68, pp.167–181. Available at: [www.elsevier.com](http://www.elsevier.com) [Accessed October 18, 2017].
- Arolt, V., Dilling, H. & Reimer, C., 2011. Basiswissen Psychiatrie und Psychotherapie. In Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 177–188.
- Báez-Ruiz, A. & Díaz-Muñoz, M., 2011. Chronic inhibition of endoplasmic reticulum calcium-release channels and calcium-ATPase lengthens the period of hepatic clock gene *Per1*. *Journal of Circadian Rhythms*, 9(1). Available at: <http://www.jcircadianrhythms.com/content/9/1/6>.
- Baldessarini, R.J. et al., 2006. Decreased risk of suicides and attempts during long-term lithium treatment: a meta-analytic review. *Bipolar Disorders*, 8(5p2), pp.625–639. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17042835> [Accessed October 25, 2017].
- Bamne, M.N. et al., 2013. Application of an ex vivo cellular model of circadian variation for bipolar disorder research: A proof of concept study. *Bipolar Disorders*, 15(6), pp.694–700.
- Barbini, B. et al., 2005. Dark therapy for mania: A pilot study. *Bipolar Disorders*, 7(1), pp.98–101.
- Becker-Weimann, S. et al., 2004. Modeling feedback loops of the mammalian circadian oscillator. *Biophysical Journal*, 87, pp.3023–34. Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC1304775/pdf/3023.pdf> [Accessed June 9, 2017].
- Belmaker, R.H., 2004. Medical Progress: Bipolar disorder. *The New England Journal of Medicine*, 351(2), pp.476–86. Available at: <http://www-1nejm-1org-1pubmed.han.medunigraz.at/doi/pdf/10.1056/NEJMra035354> [Accessed October 25,

- 2017].
- Benedetti, F. et al., 2003. Influence of CLOCK gene polymorphism on circadian mood fluctuation and illness recurrence in bipolar depression. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)*, 123B(1), pp.23–26. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.b.20038>.
- Bengesser et al., 2018. ER stress in Bipolar Disorder? – Imbalance of BiP, XBP1 and LMAN2L in the Protein Folding Factory.
- Bengesser, S.A., Fuchs, R., et al., 2016. Endoplasmic Reticulum Stress and Bipolar Disorder - Almost Forgotten Therapeutic Drug Targets in the Unfolded Protein Response Pathway Revisited. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 45168(15), pp.403–413.
- Bengesser, S.A., Reininghaus, E.Z., et al., 2016. Is the molecular clock ticking differently in bipolar disorder? Methylation analysis of the clock gene ARNTL. *The World Journal of Biological Psychiatry*, pp.1–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27739341> [Accessed October 28, 2017].
- Bengesser, S.A., 2016. *Shared Pathways between Obesity and Bipolar Disorder : Endoplasmic Reticulum Stress , Oxidative Stress and the Circadian Clock - Genetic and Epigenetic Analysis*. Medical University of Graz.
- Bengesser, S. & Reininghaus, E., 2013. Genetics of Bipolar Disorder. In Frankfurt am Main: Internationaler Verlag der Wissenschaften, pp. 44, 52, 72–76, 80–87.
- BIO-RAD, 2006. Real-time PCR: Applications Guide. In *Bio-Rad laboratories*. pp. 1–28, 34–44. Available at: <http://www.gene-quantification.com/real-time-pcr-guide-bio-rad.pdf> [accessed December 17, 2017].
- Biosystems, A., 2008. *Application Note, Real-Time PCR: Understanding CT*, Foster City. Available at: <http://sequencingfacility.med.monash.edu.au/pdf/understanding.pdf> [accessed January 24, 2017].
- Blond, B.N., Fredericks, C.A. & Blumberg, H.P., 2012. Functional neuroanatomy of bipolar disorder: Structure, function, and connectivity in an amygdala-anterior paralimbic neural system. *Bipolar Disorders*, 14(4), pp.340–355. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3880745/pdf/nihms538722.pdf> [Accessed October 27, 2017].
- Bown, C. et al., 2000. Increased Temporal Cortex ER Stress Proteins in Depressed Subjects Who Died by Suicide. *Neuropsychopharmacology*, 22(3), pp.327–332. Available at: <http://www-1nature-1com-1pubmed.han.medunigraz.at/npp/journal/v22/n3/pdf/1395415a.pdf> [Accessed September 7, 2017].
- Bown, C.D. et al., 2002. Regulation of ER stress proteins by valproate: therapeutic

- implications. *Bipolar disorders*, 4(2), pp.145–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12071512>.
- Bunger, M.K. et al., 2000. Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell*, 103(7), pp.1009–1017. Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC3779439/pdf/nihms517125.pdf> [Accessed June 7, 2017].
- Bustin, S.A. et al., 2009. The MIQE guidelines: Minimum Information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), pp.611–622.
- Campbell, N.A. & Reece, J.B., 2009. Biologie. In München: Pearson Deutschland GmbH, pp. 144–146, 538–547.
- Carlborg, A. et al., 2015. Population study of disease burden, management, and treatment of bipolar disorder in Sweden: A retrospective observational registry study. *Bipolar Disorders*, 17(1), pp.76–85.
- Cases, O. et al., 1995. Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science*, 268(5218), pp.1763–1766. Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC2844866/pdf/nihms183836.pdf> [Accessed November 12, 2017].
- Chapman, J.R. & Waldenström, J., 2015. With reference to reference genes: A systematic review of endogenous controls in gene expression studies. *PLoS ONE*, 10(11).
- Charrier, A. et al., 2017. Clock Genes and Altered Sleep–Wake Rhythms: Their Role in the Development of Psychiatric Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), p.938 (1-22). Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC5454851/pdf/ijms-18-00938.pdf> [Accessed June 10, 2017].
- Chen, B., Wang, J.-F. & Young, L.T., 2000. Chronic Valproate Treatment Increases Expression of Endoplasmic Reticulum Stress Proteins in the Rat Cerebral Cortex and Hippocampus. *Society of Biological Psychiatry*, 48(11), pp.658–664. Available at: [http://ac.els-cdn.com/S0006322300008787/1-s2.0-S0006322300008787-main.pdf?\\_tid=080d5b6c-930b-11e7-871b-00000aacb362&acdnat=1504706305\\_28001067f4e1839322c5f4ade738f525](http://ac.els-cdn.com/S0006322300008787/1-s2.0-S0006322300008787-main.pdf?_tid=080d5b6c-930b-11e7-871b-00000aacb362&acdnat=1504706305_28001067f4e1839322c5f4ade738f525) [Accessed September 6, 2017].
- Clark, D.P., 2006. Molecular Biology - Understanding the Genetic Revolution. In München: Elsevier GmbH, pp. 646–657.
- Consortium, T.W.T.C.C., 2007. Genome-wide association study of 14 000 cases of seven common diseases and 3 000 shared controls. *Nature*, 447(7145), pp.661–678.

- Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC2719288/pdf/ukmss-4894.pdf>  
[Accessed November 5, 2017].
- Craddock, N. et al., 1995. No evidence for allelic association between bipolar disorder and monoamine oxidase A gene polymorphisms. *American journal of medical genetics*, 60(4), pp.322–4. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.1320600412>  
[Accessed November 12, 2017].
- Cretenet, G., Le Clech, M. & Gachon, F., 2010. Circadian Clock-Coordinated 12 Hr Period Rhythmic Activation of the IRE1 $\alpha$  Pathway Controls Lipid Metabolism in Mouse Liver. *Cell Metabolism*, 11(1), pp.47–57.
- Crosio, C. et al., 2000. Light induces chromatin modification in cells of the mammalian circadian clock. *Nature Neuroscience*, 3(12), pp.1241–1247. Available at: [http://www-1nature-1com-1pubmed.han.medunigraz.at/neuro/journal/v3/n12/pdf/nn1200\\_1241.pdf](http://www-1nature-1com-1pubmed.han.medunigraz.at/neuro/journal/v3/n12/pdf/nn1200_1241.pdf) [Accessed June 17, 2017].
- Dale, J.W., Schantz, M. von & Plant, N., 2012. From Genes to Genomes - Concepts and Applications of DNA Technology. In Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons, pp. 109–130.
- Debruyne, J.P., Weaver, D.R. & Reppert, S.M., 2007. CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nature neuroscience*, 10(5), pp.543–545.
- Dellas, C., 2011. Crashkurs Pharmakologie. In München: Elsevier GmbH, pp. 223–224, 264–276.
- Díaz-Villanueva, J.F., Díaz-Molina, R. & García-González, V., 2015. Protein folding and mechanisms of proteostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), pp.17193–17230. Available at: [www.mdpi.com/journal/ijms](http://www.mdpi.com/journal/ijms) [Accessed June 28, 2017].
- Dmitrzak-Weglarz, M.P. et al., 2015. Clock gene variants differentiate mood disorders. *Molecular Biology Reports*, 42(1), pp.277–288. Available at: <https://link-1springer-1com-1pubmed.han.medunigraz.at/content/pdf/10.1007%2Fs11033-014-3770-9.pdf>  
[Accessed November 6, 2017].
- Dow, G.S. et al., 2005. Transcriptional profiling of mefloquine-induced disruption of calcium homeostasis in neurons in vitro. *Genomics*, 86(5), pp.539–550. Available at: [http://ac.els-cdn.com/S0888754305001904/1-s2.0-S0888754305001904-main.pdf?\\_tid=9c337484-930b-11e7-bf7d-00000aab0f27&acdnat=1504706553\\_615938f559707b1362ac7124adb93be1](http://ac.els-cdn.com/S0888754305001904/1-s2.0-S0888754305001904-main.pdf?_tid=9c337484-930b-11e7-bf7d-00000aab0f27&acdnat=1504706553_615938f559707b1362ac7124adb93be1)  
[Accessed September 6, 2017].

- Dufey, E. et al., 2014. Cellular Mechanisms of Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Health and Disease. 1. An overview. *Am J Physiol Cell Physiol*, 307, pp.582–594. Available at: <http://ajpcell-1physiology-1org-1pubmed.han.medunigraz.at/content/ajpcell/307/7/C582.full.pdf> [Accessed June 28, 2017].
- Dunlap, J.C., 1999. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 96(2), pp.271–290. Available at: [http://ac-1els-2cdn-1com-1pubmed.han.medunigraz.at/S0092867400805668/1-s2.0-S0092867400805668-main.pdf?\\_tid=91cd0ff6-534a-11e7-82f3-00000aacb362&acdnat=1497696720\\_d3516b602d71c4f6e636cea42dec294f](http://ac-1els-2cdn-1com-1pubmed.han.medunigraz.at/S0092867400805668/1-s2.0-S0092867400805668-main.pdf?_tid=91cd0ff6-534a-11e7-82f3-00000aacb362&acdnat=1497696720_d3516b602d71c4f6e636cea42dec294f) [Accessed June 17, 2017].
- Etchegaray, J.-P. et al., 2009. Casein Kinase 1 Delta Regulates the Pace of the Mammalian Circadian Clock. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 29(14), pp.3853–3866. Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC2704743/pdf/0338-09.pdf> [Accessed June 14, 2017].
- Ferreira, M.A.R. et al., 2008. Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. *Nature Genetics*, 40(9), pp.1056–1058. Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC2703780/pdf/ukmss-27163.pdf> [Accessed November 5, 2017].
- Frank, E., 2007. Interpersonal and Social Rhythm Therapy: A Means of Improving Depression and Preventing Relapse in Bipolar Disorder. *Journal of Clinical Psychology*, 63(5), pp.463–473.
- Frank, E. et al., 2005. Two-year outcomes for interpersonal and social rhythm therapy in individuals with bipolar I disorder. *Archives of general psychiatry*, 62(9), pp.996–1004. Available at: <http://archpsyc.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archpsyc.62.9.996> [Accessed October 25, 2017].
- Gastpar, M.T., Kasper, S. & Linden, M., 2003. *Psychiatrie und Psychotherapie*. In Wien: Springer-Verlag, pp. 141–149.
- Geddes, J.R. & Miklowitz, D.J., 2013. Treatment of bipolar disorder. *Lancet*, 381(9878). Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC3876031/pdf/nihms-537415.pdf> [Accessed October 24, 2017].
- Geoffroy, P.A. et al., 2015. Genetic association study of circadian genes with seasonal pattern in bipolar disorders. *Scientific Reports*, 5(1). Available at:

- <http://www.nature.com/articles/srep10232> [Accessed December 13, 2016].
- Glembotski, C.C., 2007. Endoplasmic reticulum stress in the heart. *Circulation Research*, 101(10), pp.975–984.
- Gonzalez, R. et al., 2015. Identification of circadian gene variants in bipolar disorder in Latino populations. *Journal of Affective Disorders*, 186, pp.367–375. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2015.07.014>.
- Hampf, G. et al., 2008. Report Regulation of Monoamine Oxidase A by Circadian-Clock Components Implies Clock Influence on Mood. *Current Biology*, 18, pp.678–683. Available at: [http://ac-1els-2cdn-1com-1pubmed.han.medunigraz.at/S096098220800451X/1-s2.0-S096098220800451X-main.pdf?\\_tid=de2a40b8-51aa-11e7-9e16-00000aacb35f&acdnat=1497518177\\_792b2bce52b2ac6983acb418e9eb1acb](http://ac-1els-2cdn-1com-1pubmed.han.medunigraz.at/S096098220800451X/1-s2.0-S096098220800451X-main.pdf?_tid=de2a40b8-51aa-11e7-9e16-00000aacb35f&acdnat=1497518177_792b2bce52b2ac6983acb418e9eb1acb) [Accessed June 15, 2017].
- Han, J. et al., 2013. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nature Cell Biology*, 15(5), pp.481–490. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3692270/pdf/nihms-485042.pdf> [Accessed September 4, 2017].
- Hastings, M.H., Reddy, A.B. & Maywood, E.S., 2003. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(8), pp.649–661. Available at: <http://www-1nature-1com-1pubmed.han.medunigraz.at/nrn/journal/v4/n8/pdf/nrn1177.pdf> [Accessed June 12, 2017].
- Hayashi, A. et al., 2009. Aberrant endoplasmic reticulum stress response in lymphoblastoid cells from patients with bipolar disorder. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 12(1), pp.33–43. Available at: [https://oup-1silverchair-2cdn-1com-1pubmed.han.medunigraz.at/oup/backfile/Content\\_public/Journal/ijnp/12/1/10.1017/S1461145708009358/2/12-1-33.pdf?Expires=1498477707&Signature=PsWfJYMNpriFpkeQXGbW6kWaPjNCBxPJ8dazmnSZ2IZ6MhdFmiPOaRlnjX5i~sZDtgHuhzsGxRpc59w](https://oup-1silverchair-2cdn-1com-1pubmed.han.medunigraz.at/oup/backfile/Content_public/Journal/ijnp/12/1/10.1017/S1461145708009358/2/12-1-33.pdf?Expires=1498477707&Signature=PsWfJYMNpriFpkeQXGbW6kWaPjNCBxPJ8dazmnSZ2IZ6MhdFmiPOaRlnjX5i~sZDtgHuhzsGxRpc59w) [Accessed June 25, 2017].
- Hetz, C. & Glimcher, L.H., 2009. Fine tuning of the Unfolded Protein Response: Assembling the IRE1 $\alpha$  interactome. *Mol Cell*, 35(5). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3101568/pdf/nihms167849.pdf> [Accessed September 4, 2017].
- Horn, F., 2009. Biochemie des Menschen. In Stuttgart: Georg Thieme Verlag, pp. 295–302, 449–450.

- Huang, S.-Y. et al., 2008. Neither single-marker nor haplotype analyses support an association between monoamine oxidase A gene and bipolar disorder. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 258(6), pp.350–356. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18437281> [Accessed November 13, 2017].
- Hughes, M.E. et al., 2009. Harmonics of circadian gene transcription in mammals. *PLoS Genetics*, 5(4).
- Ikeda, M. et al., 2003. Circadian dynamics of cytosolic and nuclear Ca<sup>2+</sup> in single suprachiasmatic nucleus neurons. *Neuron*, 38(2), pp.253–263.
- Innis, M.A. et al. eds., 1990. PCR Protocols - A Guide to Methods and Applications. In San Diego, California: Academic Press Inc., p. 15.
- Jackson, A. et al., 2003. A systematic review of manic and depressive prodromes. *Journal of affective disorders*, 74(3), pp.209–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12738039> [Accessed June 20, 2017].
- Jacobsen, N.J.O. et al., 1999. ATP2A2 mutations in Darier's disease and their relationship to neuropsychiatric phenotypes. *Human Molecular Genetics*, 8(9), pp.1631–1636. Available at: [https://watermark-1silverchair-1com-1pubmed.han.medunigraz.at/api/watermark?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW\\_Ercy7Dm3ZL\\_9Cf3qfKAc485ysgAAAfAwggHsBgkqhkiG9w0BBwagggHdMIIB2QIBADCCAdIGCSqGSIB3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMpqhI7g5JSkp6NnOeAgEQgIIBoxjSQciAxJyzBbD\\_I](https://watermark-1silverchair-1com-1pubmed.han.medunigraz.at/api/watermark?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAfAwggHsBgkqhkiG9w0BBwagggHdMIIB2QIBADCCAdIGCSqGSIB3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMpqhI7g5JSkp6NnOeAgEQgIIBoxjSQciAxJyzBbD_I) [Accessed September 7, 2017].
- Jann, M.W., 2014. Diagnosis and Treatment of Bipolar Disorders in Adults: A Review of the Evidence on Pharmacologic Treatments. *American Health & Drug Benefits*, 7(9), pp.489–499. Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC4296286/pdf/ahdb-07-489.pdf> [Accessed October 24, 2017].
- Jaworska-Andryszewska, P. & Rybakowski, J., 2016. Negative experiences in childhood and the development and course of bipolar disorder. *Psychiatr. Pol*, 50(5), pp.989–1000. Available at: [www.psychiatriapolska.pl](http://www.psychiatriapolska.pl) [Accessed October 29, 2017].
- Jayanthi, S. et al., 2004. Methamphetamine induces neuronal apoptosis via cross-talks between endoplasmic reticulum and mitochondria-dependent death cascades. *The FASEB Journal*, 18(2), pp.238–251. Available at: <http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.03-0295com>.
- Johansson, C. et al., 2003. Circadian Clock-Related Polymorphisms in Seasonal Affective Disorder and their Relevance to Diurnal Preference. *Neuropsychopharmacology*, 28(4), pp.734–739. Available at: <http://www-1nature-1com-1pubmed.han.medunigraz.at/npp/journal/v28/n4/pdf/1300121a.pdf> [Accessed November 3, 2017].

- Jolley, C.C. et al., 2014. A mammalian circadian clock model incorporating daytime expression elements. *Biophysical Journal*, 107(6), pp.1462–1473. Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC4167299/pdf/main.pdf> [Accessed June 7, 2017].
- Jung, U. et al., 2013. A universal TaqMan-based RT-PCR protocol for cost-efficient detection of small noncoding RNA. *Cold Spring Harbor Laboratory Press for the RNA Society*, 19, pp.1864–1873.
- Kakiuchi, C. et al., 2005. Functional polymorphisms of HSPA5: Possible association with bipolar disorder. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336(4), pp.1136–1143. Available at: [http://ac.els-cdn.com/S0006291X05019820/1-s2.0-S0006291X05019820-main.pdf?\\_tid=1e9aef40-970a-11e7-91f2-00000aacb35d&acdnat=1505145718\\_60c807d058208131f019f917fe31326d](http://ac.els-cdn.com/S0006291X05019820/1-s2.0-S0006291X05019820-main.pdf?_tid=1e9aef40-970a-11e7-91f2-00000aacb35d&acdnat=1505145718_60c807d058208131f019f917fe31326d) [Accessed September 11, 2017].
- Kakiuchi, C. et al., 2003. Impaired feedback regulation of XBP1 as a genetic risk factor for bipolar disorder. *Nature Genetics*, 35(2), pp.171–175. Available at: <http://www-1nature-1com-1pubmed.han.medunigraz.at/ng/journal/v35/n2/pdf/ng1235.pdf> [Accessed September 11, 2017].
- Kakiuchi, C. et al., 2009. Valproate, a mood stabilizer, induces WFS1 expression and modulates its interaction with ER stress protein GRP94. *PLoS ONE*, 4(1). Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC2607540/pdf/pone.0004134.pdf> [Accessed September 6, 2017].
- Kawada, Y. et al., 1995. Possible Association between Monoamine Oxidase A Gene and Bipolar Affective Disorder. *Am. J. Hum. Genet*, 56, pp.335–336. Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC1801323/pdf/ajhg00027-0343.pdf> [Accessed October 31, 2017].
- Klerman, E.B. et al., 1998. Nonphotic entrainment of the human circadian pacemaker. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 274(4), pp.R991–R996. Available at: <http://ajpregu.physiology.org/content/ajpregu/274/4/R991.full.pdf> [Accessed June 17, 2017].
- Koyanagi, S. et al., 2011. cAMP-response Element (CRE)-mediated transcription by Activating Transcription Factor-4 (ATF4) is essential for circadian expression of the Period2 gene. *Journal of Biological Chemistry*, 286(37), pp.32416–32423.
- Kripke, D.F. et al., 2009. Circadian polymorphisms associated with affective disorders.

- Journal of Circadian Rhythms*, 7(2). Available at:  
<http://www.jcircadianrhythms.com/content/7/1/2> [Accessed June 15, 2017].
- Lamont, E. et al., 2010. Circadian Rhythms and Clock Genes in Psychotic Disorders. *The Israel Journal of Psychiatry and Related Sciences*, 47, pp.27–35.
- Lamont, E.W. et al., 2007. The role of circadian clock genes in mental disorders. *Dialogues Clin Neurosci*, 9(3), pp.333–342. Available at: [www.dialogues-cns.org](http://www.dialogues-cns.org) [Accessed November 6, 2017].
- Langmesser, S. et al., 2008. Interaction of circadian clock proteins PER2 and CRY with BMAL1 and CLOCK. *BMC Molecular Biology*, 9(41). Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC2383916/pdf/1471-2199-9-41.pdf> [Accessed June 7, 2017].
- Le-Niculescu, H. et al., 2009. Convergent functional genomics of genome-wide association data for bipolar disorder: Comprehensive identification of candidate genes, pathways and mechanisms. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 150B(2), pp.155–181. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.b.30887> [Accessed June 10, 2017].
- Le-Niculescu, H. et al., 2008. Convergent functional genomics of genome-wide association data for bipolar disorder: Comprehensive identification of candidate genes, pathways and mechanisms. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 150(2), pp.155–181.
- Lee, H.-Y. et al., 2013. The protective role of Bax Inhibitor-1 against chronic mild stress through the inhibition of monoamine oxidase A. *Scientific Reports*, 3(3398). Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC3844965/pdf/srep03398.pdf> [Accessed November 13, 2017].
- Lenz, G. & Küfferle, B., 2008. *Klinische Psychiatrie* 3. Auflage., Wien: Facultas Verlags- und Buchhandels AG.
- Li, Y. et al., 2014. New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 46(8), pp.629–640. Available at: [https://watermark.silverchair.com/api/watermark?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW\\_Ercy7Dm3ZL\\_9Cf3qfKAc485ysgAAAc4wggHKBgkqhkiG9w0BBwagggG7MIIBtwIBADCCAbAGCSqGS1b3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMzmUyVQkGINLcebuMAgEQgIIBgcsNtmaTHPynRZ6I9DfegjBhcP8chyjarf\\_SEooWljDC](https://watermark.silverchair.com/api/watermark?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAc4wggHKBgkqhkiG9w0BBwagggG7MIIBtwIBADCCAbAGCSqGS1b3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMzmUyVQkGINLcebuMAgEQgIIBgcsNtmaTHPynRZ6I9DfegjBhcP8chyjarf_SEooWljDC) [Accessed September 4, 2017].
- Li, Z. et al., 2017. Valproate Attenuates Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis in SH-SY5Y Cells via the AKT/GSK3 $\beta$  Signaling Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 18. Available at: [www.mdpi.com/journal/ijms](http://www.mdpi.com/journal/ijms) [Accessed

- September 14, 2017].
- Lin, Y.-M.J. et al., 2008. Association analysis of monoamine oxidase A gene and bipolar affective disorder in Han Chinese. *Behavioral and brain functions*, 4(21). Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC2435104/pdf/1744-9081-4-21.pdf> [Accessed October 31, 2017].
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, 25(4), pp.402–408. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202301912629> [Accessed February 3, 2017].
- Lodish, H. et al., 2000. Post-Translational Modifications and Quality Control in the Rough ER. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21741/> [Accessed February 23, 2018].
- Lowrey, P.L. & Takahashi, J.S., 2004. Mammalian Circadian Biology: Elucidating Genome-Wide Levels of Temporal Organization. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 5, pp.407–441. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.genom.5.061903.175925>.
- Malhotra, J.D. & Kaufman, R.J., 2007. Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress: A Vicious Cycle or a Double-Edged Sword? *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*, 9(12). Available at: [https://deepblue.lib.umich.edu/bitstream/handle/2027.42/63268/ars.2007.1782.lowlin k.pdf\\_v03.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://deepblue.lib.umich.edu/bitstream/handle/2027.42/63268/ars.2007.1782.lowlin k.pdf_v03.pdf?sequence=1&isAllowed=y) [Accessed July 2, 2017].
- Mansour, H.A. et al., 2009. Association study of 21 circadian genes with bipolar I disorder, schizoaffective disorder, and schizophrenia. *Bipolar disorders*, 11(7), pp.701–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19839995> [Accessed December 13, 2016].
- Mansour, H.A. et al., 2006. Association study of eight circadian genes with bipolar I disorder, schizoaffective disorder and schizophrenia. *Genes, Brain and Behavior*, 5(2), pp.150–157.
- Matsumura, R. et al., 2013. Nuclear receptor-mediated cell-autonomous oscillatory expression of the circadian transcription factor, neuronal pas domain protein 2 (NPAS2). *Journal of Biological Chemistry*, 288(51), pp.36548–36553. Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC3868767/pdf/zbc36548.pdf> [Accessed June 15, 2017].
- McCarthy, M.J. et al., 2012. A Survey of Genomic Studies Supports Association of Circadian Clock Genes with Bipolar Disorder Spectrum Illnesses and Lithium

- Response. *PLoS ONE*, 7(2).
- McClung, C.A., 2007a. Circadian Genes, Rhythms and the Biology of Mood Disorders. *Pharmacol Ther.*, 114(2), pp.222–232. Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC1925042/pdf/nihms22412.pdf> [Accessed June 21, 2017].
- McClung, C.A., 2007b. Circadian Rhythms, the Mesolimbic Dopaminergic Circuit, and Drug Addiction. *The Scientific World JOURNAL*, 7, pp.194–202. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2007/956185/abs/>.
- McClung, C.A., 2007c. Role for the Clock Gene in Bipolar Disorder. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, LXXII, pp.637–644.
- McQuade, R. & Young, A.H., 2000. Future therapeutic targets in mood disorders: the glucocorticoid receptor. *British Journal of Psychiatry*, 177, pp.390–395. Available at: <http://bjp.rcpsych.org/content/bjprcpsych/177/5/390.full.pdf> [Accessed October 27, 2017].
- Miklowitz, D.J. & Chang, K.D., 2008. Prevention of bipolar disorder in at-risk children: Theoretical assumptions and empirical foundations. *Development and Psychopathology*, 20(3), pp.881–897. Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC2504732/pdf/nihms36691.pdf> [Accessed October 29, 2017].
- Mistlberger, R.E. & Skene, D.J., 2004. Social influences on mammalian circadian rhythms: animal and human studies. *Biological Reviews*, 79(3), pp.533–556.
- Möller, H.-J., 2015. Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie. In *Duale Reihe*. Stutt: Georg Thieme Verlag KG, pp. 99–126. Available at: [http://deposit.d-nb.de/cgi-bin/dokserv?id=4221614&prov=M&dok\\_var=1&dok\\_ext=htm](http://deposit.d-nb.de/cgi-bin/dokserv?id=4221614&prov=M&dok_var=1&dok_ext=htm).
- Müller, H.-J., 2001. PCR - Das Methodenbuch. In Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, pp. 1–14, 43–73.
- Murri, M.B. et al., 2016. The HPA axis in bipolar disorder: Systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, 63, pp.327–342. Available at: [https://ac.els-cdn.com/S0306453015009622/1-s2.0-S0306453015009622-main.pdf?\\_tid=8122f0f4-ba5f-11e7-9186-00000aacb35f&acdnt=1509030681\\_c9438a4f524012ddad5b1a17900eb3ac](https://ac.els-cdn.com/S0306453015009622/1-s2.0-S0306453015009622-main.pdf?_tid=8122f0f4-ba5f-11e7-9186-00000aacb35f&acdnt=1509030681_c9438a4f524012ddad5b1a17900eb3ac) [Accessed October 26, 2017].
- Nakagawa, T. et al., 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, 403(6765), pp.98–103. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/47513> [Accessed September 7, 2017].
- Nakatani, N. et al., 2006. Genome-wide expression analysis detects eight genes with robust alterations specific to bipolar I disorder: Relevance to neuronal network

- perturbation. *Human Molecular Genetics*, 15(12), pp.1949–1962. Available at: [https://oup.silverchair-cdn.com/oup/backfile/Content\\_public/Journal/hmg/15/12/10.1093\\_hmg\\_ddl118/1/ddl118.pdf?Expires=1509284163&Signature=CE7fExDnMx0OI72Bobo1JMDG-InvkT~p4gMbsArytRjihjut2M1mNZnkwvegsglzRcAAdBeDDhFQ9ogxD1b0Gdc7aX2LynpcSLxY~hNI1IzgCzexRD8T](https://oup.silverchair-cdn.com/oup/backfile/Content_public/Journal/hmg/15/12/10.1093_hmg_ddl118/1/ddl118.pdf?Expires=1509284163&Signature=CE7fExDnMx0OI72Bobo1JMDG-InvkT~p4gMbsArytRjihjut2M1mNZnkwvegsglzRcAAdBeDDhFQ9ogxD1b0Gdc7aX2LynpcSLxY~hNI1IzgCzexRD8T) [Accessed October 28, 2017].
- Newton, C.R. & Graham, A., 1994. PCR. In Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag, pp. 19–25.
- Nievergelt, C.M. et al., 2006. Suggestive evidence for association of the circadian genes PERIOD3 and ARNTL with bipolar disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 141(3), pp.234–241. Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC2651679/pdf/nihms-68225.pdf> [Accessed October 31, 2017].
- Nöthen, M. et al., 1995. Association Analysis of the Monoamine Oxidase A Gene in Bipolar Affective Disorder by Using Family-Based Internal Controls. *Am J Hum Genet*, 57, pp.975–977. Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC1801515/pdf/ajhg00036-0239.pdf> [Accessed October 31, 2017].
- O'Neill, J.S. & Reddy, A.B., 2012. The essential role of cAMP / Ca<sup>2+</sup> signalling in mammalian circadian timekeeping. *Biochemical Society*, 40(1), pp.44–50.
- Ozcan, L. et al., 2009. Endoplasmic Reticulum Stress Plays a Central Role in Development of Leptin Resistance. *Cell Metabolism*, 9(1), pp.35–51. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2008.12.004>.
- Pallaskorpi, S. et al., 2017. Incidence and predictors of suicide attempts in bipolar I and II disorders: A 5-year follow-up study. *Bipolar Disorders*, 19(1), pp.13–22.
- Pereira, D.S. et al., 2005. Association of the length polymorphism in the human Per3 gene with the delayed sleep-phase syndrome: does latitude have an influence upon it? *Sleep*, 28(1), pp.29–32. Available at: [https://oup-1silverchair-2cdn-1com-1pubmed.han.medunigraz.at/oup/backfile/Content\\_public/Journal/sleep/28/1/10.1093\\_sleep\\_28.1.29/2/sleep-28-1-29.pdf?Expires=1509713375&Signature=dWNNqR3SxPIbuNACDD9TWL1IGjclh5wp6gq2PTvyaWoWVoPG3iaYzZ7EMUKjxlspyR0VpTHPw-G3](https://oup-1silverchair-2cdn-1com-1pubmed.han.medunigraz.at/oup/backfile/Content_public/Journal/sleep/28/1/10.1093_sleep_28.1.29/2/sleep-28-1-29.pdf?Expires=1509713375&Signature=dWNNqR3SxPIbuNACDD9TWL1IGjclh5wp6gq2PTvyaWoWVoPG3iaYzZ7EMUKjxlspyR0VpTHPw-G3) [Accessed November 2, 2017].
- Pfaffenseller, B. et al., 2014. Impaired endoplasmic reticulum stress response in bipolar disorder: cellular evidence of illness progression. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 17(9), pp.1453–1463. Available at: <https://watermark.silverchair.com/api/watermark?token=AQECAHi208BE49Ooan9kk>

- hW\_Ercy7Dm3ZL\_9Cf3qfKAc485ysgAAAeEwggHdBgkqhkiG9w0BBwagggHOMIIBygIBADCCAcMGCSqGSib3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMwoeCtGmx5-l3a7usAgEQgIIBIJZN8zBaerZG6zEn8YUQPFIGc\_FgoEgPe2GZgKAENGuc1  
[Accessed September 6, 2017].
- Pfaffl, M.W., 2004. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum*, 10(1), pp.92–95. Available at: c:%5CKarsten%5CPDFs%5CMethodik-PDFs%5CMethodik-2004%5CPfaffl-Real-time RT-PCR- Neue Ansaetze zur exakten mRNA Quantifizierung.pdf.
- Pluquet, O. et al., 2013. Posttranscriptional Regulation of PER1 Underlies the Oncogenic Function of IREα. *American Association for Cancer Research*, 73(15).
- Pluquet, O., Dejeans, N. & Chevet, E., 2014. Watching the clock: Endoplasmic reticulum-mediated control of circadian rhythms in cancer. *Annals of Medicine*, 46(4), pp.233–243.
- Porterfield, V.M. & Mintz, E.M., 2009. Temporal patterns of light-induced immediate-early gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience Letters*, 463(1), pp.70–73. Available at: [http://ac.els-cdn.com/S0304394009010155/1-s2.0-S0304394009010155-main.pdf?\\_tid=4c77e592-78b8-11e6-a02d-00000aab0f26&acdnat=1473664543\\_5b29b89a3325aa3c5b2cba08127595a5](http://ac.els-cdn.com/S0304394009010155/1-s2.0-S0304394009010155-main.pdf?_tid=4c77e592-78b8-11e6-a02d-00000aab0f26&acdnat=1473664543_5b29b89a3325aa3c5b2cba08127595a5).
- Preisig, M. et al., 2000. Association Between Bipolar Disorder and Monoamine Oxidase A Gene Polymorphisms: Results of a Multicenter Study. *Am J Psychiatry*, 157, pp.948–955. Available at: <http://ajp.psychiatryonline.org/doi/pdf/10.1176/appi.ajp.157.6.948>  
[Accessed October 28, 2017].
- Rasool, R. et al., 2017. AKT is indispensable for coordinating Par-4/JNK cross talk in p21 downmodulation during ER stress. *Oncogenesis*, 6. Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC5523074/pdf/oncsis201741a.pdf>  
[Accessed September 7, 2017].
- Reppert, S.M. & Weaver, D.R., 2002. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, 418(6901), pp.935–941. Available at: <http://www-1nature-1com-1pubmed.han.medunigraz.at/nature/journal/v418/n6901/pdf/nature00965.pdf>  
[Accessed June 7, 2017].
- Reza, M. et al., 2015. Monoamine Oxidase A Gene Polymorphisms and Bipolar Disorder in Iranian Population. *Iran Red Crescent Med J*, 17(2). Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC4353216/pdf/ircmj-17-02-23095.pdf>  
[Accessed October 31, 2017].
- Rocha, P.M.B. et al., 2017. Genetic Association of the PERIOD3 (Per3) Clock Gene with

- Bipolar Disorder. *Korean Neuropsychiatric Association*, 14(5), pp.674–680. Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC5639137/pdf/pi-14-674.pdf> [Accessed December 14, 2017].
- Rothenhäusler, H.-B. & Täschner, K.-L., 2013. Kompendium Praktische Psychiatrie. In Wien: Springer-Verlag, pp. 322–332.
- Roybal, K. et al., 2007. Mania-like behavior induced by disruption of CLOCK. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(15), pp.6406–6411. Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC1851061/pdf/zpq6406.pdf> [Accessed November 3, 2017].
- Rubinsztein, D.C. et al., 1996. Genetic association between monoamine oxidase A microsatellite and RFLP alleles and bipolar affective disorder: analysis and meta-analysis. *Human Molecular Genetics*, 5(6). Available at: [https://watermark-1silverchair-1com-1pubmed.han.medunigraz.at/5-6-779.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW\\_Ercy7Dm3ZL\\_9Cf3qfKAc485ysgAAAb8wggG7BgkqhkiG9w0BBwagggGsMIIBqAIBADCCAaEGCSqGSIb3DQEHATAeBgIghkgBZQMEAS4wEQQMzihWQqOFiyq-DrJEAgEQgIIBcrLTQKz4YGT27EDmzDH](https://watermark-1silverchair-1com-1pubmed.han.medunigraz.at/5-6-779.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAb8wggG7BgkqhkiG9w0BBwagggGsMIIBqAIBADCCAaEGCSqGSIb3DQEHATAeBgIghkgBZQMEAS4wEQQMzihWQqOFiyq-DrJEAgEQgIIBcrLTQKz4YGT27EDmzDH) [Accessed November 12, 2017].
- Saito, A. et al., 2011. Endoplasmic reticulum stress response mediated by the PERK-eIF2alpha-ATF4 pathway is involved in osteoblast differentiation induced by BMP2. *Journal of Biological Chemistry*, 286(6), pp.4809–4818. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3039352/pdf/zbc4809.pdf> [Accessed September 3, 2017].
- Sano, R. & Reed, J.C., 2013. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(12), pp.3460–3470. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3834229/pdf/nihms509150.pdf> [Accessed September 4, 2017].
- Sanz, E. et al., 2009. PF9601N [N-(2-propynyl)-2-(5-benzyloxy-indolyl) methylamine] confers MAO-B independent neuroprotection in ER stress-induced cell death. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 41(1), pp.19–31. Available at: [https://ac.els-cdn.com/S1044743109000177/1-s2.0-S1044743109000177-main.pdf?\\_tid=2a305732-c7de-11e7-99dd-00000aab0f02&acdnat=1510514447\\_9085969ea966802f6fc6582660dc6c21](https://ac.els-cdn.com/S1044743109000177/1-s2.0-S1044743109000177-main.pdf?_tid=2a305732-c7de-11e7-99dd-00000aab0f02&acdnat=1510514447_9085969ea966802f6fc6582660dc6c21) [Accessed November 12, 2017].
- Saß, H. et al., 2003. Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen - Textrevision -. In Göttingen: Hogrefe-Verlag, pp. 393–478.

- Scientific, T.F., 2014. Real-Time PCR Handbook. *Thermo Fisher Scientific Inc.*, pp.2–15. Available at: <http://www.thermofisher.com/at/en/home/global/forms/real-time-pcr-handbook-lt.html> [Accessed January 24, 2017].
- Scott, A.L. et al., 2008. Novel monoamine oxidase A knock out mice with human-like spontaneous mutation. *Neuroreport*, 19(7), pp.739–43. Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC3435113/pdf/nihms-400240.pdf> [Accessed November 12, 2017].
- Scott, L.J. et al., 2009. Genome-wide association and meta-analysis of bipolar disorder in individuals of European ancestry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(18), pp.7501–7506. Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC2678639/pdf/zpq7501.pdf> [Accessed November 5, 2017].
- Seleem, M.A. et al., 2015. The longitudinal course of sleep timing and circadian preferences in adults with bipolar disorder. *Bipolar Disorders*, 17(4), pp.392–402.
- Shan, G.W., Makmor-Bakry, M. & Omar, M.S., 2016. Long term use of lithium and factors associated with treatment response among patients with bipolar disorder. *Psychiatria Danubina*, 28(2), pp.146–153. Available at: [http://www.hdbp.org/psychiatria\\_danubina/pdf/dnb\\_vol28\\_no2/dnb\\_vol28\\_no2\\_146.pdf](http://www.hdbp.org/psychiatria_danubina/pdf/dnb_vol28_no2/dnb_vol28_no2_146.pdf) [Accessed October 24, 2017].
- Shao, L. et al., 2005. Mood stabilizing drug lithium increases expression of endoplasmic reticulum stress proteins in primary cultured rat cerebral cortical cells. *Life Sciences*, 78(12), pp.1317–1323. Available at: [http://ac.els-cdn.com/S0024320505009124/1-s2.0-S0024320505009124-main.pdf?\\_tid=6d752a8e-930b-11e7-85ab-00000aacb362&acdnat=1504706475\\_16d96b092670f7fb76da53cbf5c6d2b8](http://ac.els-cdn.com/S0024320505009124/1-s2.0-S0024320505009124-main.pdf?_tid=6d752a8e-930b-11e7-85ab-00000aacb362&acdnat=1504706475_16d96b092670f7fb76da53cbf5c6d2b8) [Accessed September 6, 2017].
- Shearman, L.P. et al., 2000. Interacting Molecular Loops in the Mammalian Circadian Clock. *Science*, 288(5468), pp.1013–1019. Available at: <http://science-1sciencemag-1org-1pubmed.han.medunigraz.at/content/sci/288/5468/1013.full.pdf> [Accessed June 7, 2017].
- Shi, J. et al., 2008. Clock Genes may Influence Bipolar Disorder Susceptibility and Dysfunctional Circadian Rhythm. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 147(7), pp.1047–1055. Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC2574897/pdf/nihms59744.pdf> [Accessed October 31, 2017].
- Shih, J.C., Wu, J.B. & Chen, K., 2011. Transcriptional regulation and multiple functions of MAO genes. *Journal of Neural Transmission*, 118(7), pp.979–986. Available at:

- <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC3125068/pdf/nihms291276.pdf>  
[Accessed October 31, 2017].
- Sjöholm, L.K. et al., 2010. CRY2 Is Associated with Rapid Cycling in Bipolar Disorder Patients. *PloS one*, 5(9). Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC2939397/pdf/pone.0012632.pdf>  
[Accessed December 14, 2017].
- Sklar, P. et al., 2008. Whole-genome Association Study of Bipolar Disorder. *Mol Psychiatry*, 13(6), pp.558–569. Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC3777816/pdf/nihms-418738.pdf>  
[Accessed November 5, 2017].
- So, J., Warsh, J.J. & Li, P.P., 2007. Impaired Endoplasmic Reticulum Stress Response in B-Lymphoblasts From Patients With Bipolar-I Disorder. *Biological Psychiatry*, 62(2), pp.141–147. Available at: [http://ac-1els-2cdn-1com-1pubmed.han.medunigraz.at/S0006322306013187/1-s2.0-S0006322306013187-main.pdf?\\_tid=25c27d68-598b-11e7-9cb8-00000aacb360&acdnat=1498384166\\_e382f3989eb6a2dbfb0bf3281d6b5500](http://ac-1els-2cdn-1com-1pubmed.han.medunigraz.at/S0006322306013187/1-s2.0-S0006322306013187-main.pdf?_tid=25c27d68-598b-11e7-9cb8-00000aacb360&acdnat=1498384166_e382f3989eb6a2dbfb0bf3281d6b5500)  
[Accessed June 25, 2017].
- Soria, V. et al., 2010. Differential Association of Circadian Genes with Mood Disorders: CRY1 and NPAS2 are Associated with Unipolar Major Depression and CLOCK and VIP with Bipolar Disorder. *Neuropsychopharmacology*, 35, pp.1279–1289.
- Sprenkle, N.T. et al., 2017. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in the central nervous system. *Molecular Neurodegeneration*, 12(42), p.18. Available at: [https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC5445486/pdf/13024\\_2017\\_Article\\_183.pdf](https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC5445486/pdf/13024_2017_Article_183.pdf) [Accessed June 25, 2017].
- Strakowski, S.M. et al., 2012. The functional neuroanatomy of bipolar disorder: a consensus model. *Bipolar Disord*, 14(4). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3874804/pdf/nihms538729.pdf>  
[Accessed October 27, 2017].
- Tabas, I. & Ron, D., 2011. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature Cell Biology*, 13(3), pp.184–190. Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC3107571/pdf/nihms293314.pdf>  
[Accessed September 6, 2017].
- Thiemann, F., Cullen, P.M. & Klein, H.-G., 2015. Molekulare Diagnostik - Grundlagen der Molekularbiologie, Genetik und Analytik. In Weinheim, Deutschland: Wiley-VCH

- Verlag & Co. KGaA, pp. 79–173.
- Thon, M. et al., 2014. Leptin induced GRP78 expression through the PI3K-mTOR pathway in neuronal cells. *Scientific Reports*, 4, pp.1–8.
- Toh, K.L. et al., 2001. An hPer2 Phosphorylation Site Mutation in Familial Advanced Sleep Phase Syndrome. *Science*, 291(5506), pp.1040–1043. Available at: <http://science-1sciencemag-1org-1pubmed.han.medunigraz.at/content/sci/291/5506/1040.full.pdf> [Accessed November 2, 2017].
- Tölle, R. & Windgassen, K., 2014. Psychiatrie. In Berlin, Heidelberg: Springer Medizin, pp. 237–268.
- Travnickova-Bendova, Z. et al., 2002. Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(11), pp.7728–33. Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC124335/pdf/pq1102007728.pdf> [Accessed June 17, 2017].
- Tsuang, M.T. et al., 2005. Assessing the validity of blood-based gene expression profiles for the classification of schizophrenia and bipolar disorder: A preliminary report. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 133B(1), pp.1–5. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.b.30161>.
- Turecki, G. et al., 1999. MAOA: association and linkage studies with lithium responsive bipolar disorder. *Psychiatric genetics*, 9(1), pp.13–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10335547> [Accessed November 12, 2017].
- Valenzuela, F.J. et al., 2016. Evidences of Polymorphism Associated with Circadian System and Risk of Pathologies: A Review of the Literature. *International Journal of Endocrinology*, pp.1–12. Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC4893437/pdf/IJE2016-2746909.pdf> [Accessed June 10, 2017].
- Valvassori, S.S. et al., 2017. Lithium and valproate act on the GSK-3 $\beta$  signaling pathway to reverse manic-like behavior in an animal model of mania induced by ouabain. *Neuropharmacology*, 117, pp.447–459. Available at: [https://ac.els-cdn.com/S0028390816304658/1-s2.0-S0028390816304658-main.pdf?\\_tid=a71dc520-bd95-11e7-8567-00000aab0f27&acdnat=1509383791\\_8a829852ae01b4c1641a74c96578f250](https://ac.els-cdn.com/S0028390816304658/1-s2.0-S0028390816304658-main.pdf?_tid=a71dc520-bd95-11e7-8567-00000aab0f27&acdnat=1509383791_8a829852ae01b4c1641a74c96578f250) [Accessed October 30, 2017].
- Wehr, T.A. et al., 1998. Treatment of rapidly cycling bipolar patient by using extended bed rest and darkness to stabilize the timing and duration of sleep. *Biological psychiatry*, 43(11), pp.822–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9611672>

- [Accessed November 5, 2017].
- World Health Organisation, 2016. ICD-10 Version:2016. *WHO*. Available at: <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2016/en#/F30-F39> [Accessed January 8, 2017].
- Yang, S. et al., 2009. Assessment of circadian function in fibroblasts of patients with bipolar disorder. *Molecular Psychiatry*, 14(2), pp.143–155. Available at: <http://www-1nature-1com-1pubmed.han.medunigraz.at/mp/journal/v14/n2/pdf/mp200810a.pdf> [Accessed November 5, 2017].
- Yin, L. et al., 2006. Nuclear Receptor Rev-erba Is a Critical Lithium-Sensitive Component of the Circadian Clock. *Science*, 311. Available at: <http://science-1sciencemag-1org-1pubmed.han.medunigraz.at/content/sci/311/5763/1002.full.pdf> [Accessed October 24, 2017].
- Young, A.H. & Grunze, H., 2013. Physical health of patients with bipolar disorder. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 127(SUPPL. 442).
- Zhang, K. & Kaufman, R.J., 2008. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*, 454(7203), pp.455–462. Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC2727659/pdf/nihms135449.pdf> [Accessed June 25, 2017].
- Zhang, Y. et al., 2015. Discrete Functions of Nuclear Receptor Rev-erba Couple Metabolism to the Clock. *Science. Author manuscript*, 348(6242), pp.1488–1492. Available at: <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pmc/articles/PMC4613749/pdf/nihms-730140.pdf> [Accessed June 7, 2017].

## 6 Anhang

### 6.1 PBMC-Isolierung

Table 6-1 Mischungsverhältnisse zum Herstellen von CMF-PBS

CMF-PBS für 5 Liter	
40 g	NaCl
1,5 g	KCl
0,1 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,457 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> +2H <sub>2</sub> O
10 g	Glukose

### 6.2 RNA-Isolation mittels Tri Reagent RT®: Standard Operating Procedures (SOP) des Instituts für Pathophysiologie und Immunologie der Medizinischen Universität Graz, Österreich

#### 6.2.1 Ziel

Ziel ist die Gewinnung von RNA aus Zellen bzw. Gewebe humanen und tierischen Ursprungs.

#### 6.2.2 Durchführungsort

Da das Reagenz toxisch ist, ist die Durchführung unter dem Abzug notwendig.

#### 6.2.3 Durchführung

Das Prinzip beruht auf den unterschiedlichen Löslichkeiten von RNA, DNA und Proteinen in einem zweiphasigen Gemisch aus wässriger und organischer Lösung. Zur Phasentrennung kommt es durch Zugabe eines chaotropen Denaturierungsreagenz. RNA befindet sich in der wässrigen Phase, DNA und Proteine in der Interphase und organischen Phase. Entwickelt wurde diese Methode von Piotr Chomczynski und Nicoletta Sacchi.

## 6.2.4 Protokoll

### Vorbereitung:

Zentrifuge vorkühlen

Thermoschüttler auf 55°C vorheizen

Eisbehälter Filterspitzen (groß, mittel)

1,5 ml Eppendorf beschriften: Name, RNA, Datum

Reagenzien zusammentragen: Tri Reagent RT, BAN, Isopropanol, Ethanol 75%

RNase freies Wasser

Tri Reagent enthält Phenol und ist daher giftig. Nitrilhandschuhe verwenden!

### Durchführung:

- für Gewebe: Mit 1 ml Tri Reagent RT 50 mg - 100 mg Gewebe mit dem UltraTurax 3x10 Sekunden zerkleinern. Zwischen den Schritten immer wieder auf Eis stellen. Verwendung von 15 ml Rundbodenröhrchen und anschließend in 1,5 ml Eppis überführen.
- für Zellen: 5-10 x 10<sup>6</sup> Zellen mit 1 ml Tri Reagent RT gründlich mit der Pipettenspitze resuspendieren.
- für Zellkulturflaschen: 1 ml für 10 cm<sup>2</sup> Oberfläche verwenden und 5 Minuten auf den Vortexer stellen. Suspension in 1,5 ml Eppi (je 1 ml) überführen.
- 50 µl BAN einspülen und Eppis 20x kräftig kippen, 5 Min bei RT. Phasentrennung bei 12.000 g für 15 Minuten bei 4°C.
- 500 µl des klaren Überstandes in ein neues Eppi überführen und mit 500 µl Isopropanol mischen, 20x kippen, 10 Minuten RT (den Rest aufbewahren für DNA und Proteinisolierung). Zentrifugation 8 Min 12.000g 4°C.
- Ab hier sollte ein Pellet (meist zart am Rand) zu sehen sein. Überstand abdekantieren und mit 1 ml 75% EtOH waschen. Zentrifugation 5 Min 7500 g 4°C.
- Überstand abdekantieren und kurz bei 12.000 g abzentrifugieren. Restlichen EtOH mit Pipette gründlich entfernen (Vorsicht! Pellet nicht mit aufsaugen!).
- Über Kopf 3-5 Minuten lufttrocknen bis die RNA von einem weißlichen Pellet in ein klares übergeht. Je nach Größe des Pellets mit 50 µl – 100 µl

RNase-freies Wasser resuspendieren und 10 Minuten bei 55°C lösen bei 300 rpm am Thermoschüttler. Anschließend auf Eis geben und abkühlen lassen. Vermessung am NanoDrop.