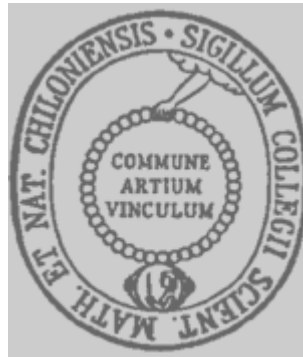


**Chronobiologische Markersysteme im Rahmen
menschlicher Alternsprozesse:
Untersuchung zur Veränderung der circadianen Rhythmik
von Uhrengen-Expression, Hormonsynthese und
Körperkerntemperatur sowie deren Interaktionen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel



vorgelegt von
Denise Olbrich
Kiel
August 2010

Referentin:..... Prof. Dr. M. Dittmar
Korreferent:..... Prof. Dr. T. Röder
Tag der mündlichen Prüfung..... 28.09.2010
Zum Druck genehmigt: Kiel,
Der Dekan

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	vi
	Abbildungsverzeichnis	ix
	Tabellenverzeichnis	xii
1	Einleitung	1
1.1	<u>Chronobiologie</u>	1
1.2	<u>Circadiane Rhythmik</u>	2
1.3	<u>Körperkerntemperatur des Menschen</u>	11
1.4	<u>Schlaf des Menschen</u>	13
1.5	<u>Gene</u>	16
1.5.1	Zusammenspiel von Uhrengenen und Rückkopplungsschleifen	17
1.5.2	Uhrengene (Zielgene)	18
1.5.2.1	<i>Humanes Brain and Muscle ARNT-like (hBMAL1)-Gen</i>	18
1.5.2.2	<i>Humanes Period homolog 1 (hPER1)-Gen</i>	19
1.5.3	Haushaltsgene	19
1.5.3.1	<i>Humanes Acidic Ribosomal Phosphoprotein P0 (hRPLP0, h36B4)-Gen</i>	20
1.5.3.2	<i>Humanes Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (hGAPDH)-Gen</i>	20
1.5.3.3	<i>Humanes Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyl Transferase (hHPRT)-Gen</i>	20
1.6	<u>Hormone</u>	21
1.6.1	Cortisol	21
1.6.2	Melatonin	24
1.7	<u>Zusammenspiel von Suprachiasmatischen Nuclei, Uhrengenen, Melatonin, Cortisol und Körperkerntemperatur</u>	27
2	Fragestellungen	29
3	Probanden, Material und Methoden	30
3.1	<u>Probanden</u>	30
3.2	<u>Material</u>	31
3.3	<u>Methoden</u>	35
3.3.1	Fragebögen	35
3.3.1.1	Allgemeiner Fragebogen	35
3.3.1.2	Freiburger Fragebogen zur Bestimmung der körperlichen Aktivität	35
3.3.1.3	Morningness-Eveningness-Questionnaire (MEQ) zur Bestimmung des Chronotyps	36

3.3.1.4	Pittsburgh Sleep-Quality-Index (PSQI)-Fragebogen zur Bestimmung der Schlafqualität	37
3.3.1.5	Epworth Sleepiness Scale (ESS)-Fragebogen zur Bestimmung der Tagesschläfrigkeit	37
3.3.1.6	Seasonal Pattern Assessment Questionnaire (SPAQ) zur Bestimmung der saisonalen Befindlichkeit	38
3.3.2	Körperkerntemperaturmessung	39
3.3.3	Anthropometrie	39
3.3.4	Probensammlung	40
3.3.5	Molekularbiologische Methoden	43
3.3.5.1	RNA-Extraktion	44
3.3.5.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	47
3.3.5.3	Enzymatische Spaltung mit dem Enzym DNaseI	47
3.3.5.4	Synthese von komplementärer DNA (cDNA) durch reverse Transkription	47
3.3.5.5	Polymerasekettenreaktion (PCR) und Echtzeit (Real Time)-PCR	49
3.3.5.6	Der LightCycler®	53
3.3.5.7	Etablierung von quantitativer Echtzeit-RT-PCR mit LightCycler® und UPL-Sondensystem	61
3.3.5.8	Erstellen von Standardkurven und Coefficient Files, Berechnung von Gen-Ratios	63
3.3.5.9	Auswahl eines Haushaltsgens	66
3.3.5.10	Relative Quantifizierung mit Hilfe des RelQuant-Programms	67
3.3.6	Hormonanalysen	67
3.3.6.1	Der Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)	68
3.3.6.2	Cortisol-ELISA zur Konzentrationsbestimmung von Cortisol im Speichel	68
3.3.6.3	Melatonin-ELISA zur Konzentrationsbestimmung von Melatonin im Speichel	72
3.3.7	Statistische Methoden	76
4	Ergebnisse	85
4.1	<u>Etablierung von Methoden</u>	85
4.1.1	Etablierung von Hormonanalysen	85
4.1.2	Etablierung von Expressionsanalysen	86
4.1.2.1	Nachweis der extrahierten RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese	87
4.1.2.2	Erfolgskontrolle der cDNA-Synthese	87
4.1.2.3	Optimierung des Lightcycler-Laufs für Ziel- und Haushaltsgene	88
4.1.2.4	Durchführung des Lightcycler-Laufs für Ziel- und Haushaltsgene	90

Inhaltsverzeichnis

4.1.2.5	Generierung einer Standardkurve für Ziel- und Haushaltsgene	93
4.1.2.6	Vergleich der Effizienzen von Zielgenen und Haushaltsgenen	95
4.1.2.7	Regulierung der Haushaltsgene	95
4.1.2.8	Interassay-Vergleich zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Messergebnisse	98
4.2	<u>Deskriptive Merkmale der Probanden</u>	100
4.2.1	Allgemeine Kennzeichen	100
4.2.2	Körperliche Aktivität	105
4.2.3	Chronotypen-Verteilung	106
4.2.4	Schlafqualität	107
4.2.5	Tagesschläfrigkeit	108
4.2.6	Jahreszeitliche Depression	109
4.2.7	Körperkerntemperatur-Profile	109
4.2.8	Cortisol-Morgenprofile und CAR	110
4.2.9	Melatonin-Abendprofile und DLMO	112
4.2.10	Tages-Expressionsprofile der Uhrengene <i>hBMAL1</i> und <i>hPER1</i>	113
4.3	<u>Gruppenvergleiche</u>	115
4.3.1	<u>Kriterium Alter</u>	115
4.3.1.1	Vergleich der Körperkerntemperatur-Profile von jüngeren und älteren Frauen	115
4.3.1.2	Vergleich der Schlafqualität von jüngeren und älteren Frauen	117
4.3.1.3	Vergleich der Cortisol-Morgenprofile, -Aufwachkonzentrationen und CAR von jüngeren und älteren Frauen	118
4.3.1.4	Vergleich der Melatonin-Abendprofile und des DLMOs von jüngeren und älteren Frauen	121
4.3.1.5	Vergleich der tageszeitlichen Expressionsprofile der Uhrengene <i>hBMAL1</i> und <i>hPer1</i> von jüngeren und älteren Frauen	123
4.3.2	<u>Kriterium Geschlecht</u>	127
4.3.2.1	Vergleich der Körperkerntemperatur-Profile von älteren Männern und Frauen	127
4.3.2.2	Vergleich der Schlafqualität von älteren Männern und Frauen	129
4.3.2.3	Vergleich der Cortisol-Morgenprofile, -Aufwachkonzentrationen und CAR von älteren Männern und Frauen	129
4.3.2.4	Vergleich der Melatonin-Abendprofile und des DLMOs von älteren Männern und Frauen	132

4.3.2.5	Vergleich der tageszeitlichen Expressionsprofile der Uhrengene <i>hBMAL1</i> und <i>hPer1</i> von älteren Männern und Frauen	134
4.3.3	<u>Kriterium Schlafqualität</u>	138
4.3.3.1	Vergleich der körperlichen Aktivität von guten und schlechten Schläfern	138
4.3.3.2	Vergleich der Körperkerntemperatur-Profile von guten und schlechten Schläfern	139
4.3.3.3	Vergleich der Cortisol-Morgenprofile und CAR von guten und schlechten Schläfern	143
4.3.3.4	Vergleich der Melatonin-Abendprofile und des DLMOs von guten und schlechten Schläfern	148
4.3.3.5	Vergleich der tageszeitlichen Expressionsprofile der Uhrengene <i>hBMAL1</i> und <i>hPer1</i> von guten und schlechten Schläfern	152
4.4	<u>Zusammenhänge zwischen den untersuchten Variablen</u>	156
4.4.1	Zusammenhänge zwischen Körperkerntemperatur und körperlicher Aktivität	156
4.4.2	Zusammenhänge zwischen CAR und Tagesschläfrigkeit	158
4.4.3	Zusammenhänge zwischen CAR und der Körperkerntemperatur	160
4.4.4	Zusammenhänge zwischen Chronotyp und Schlafdauer	161
4.4.5	Zusammenhänge zwischen Schlafdauer und CAR	164
4.4.6	Zusammenhänge zwischen Chronotyp und CAR	165
5	Diskussion	166
5.1	Beeinflussung der Schlafqualität durch exogene Faktoren und Zusammenhänge mit anderen circadianen Markersystemen	166
5.2	Unterschiede in der Rhythmik von Körperkerntemperatur und der Synthese-Rate der Hormone Cortisol und Melatonin	170
5.3	Unterschiede der circadianen Expression der Uhrengene <i>hBMAL1</i> und <i>hPER1</i> zwischen jüngeren und älteren Menschen	176
5.4	Methodenkritik	179
5.5	Ausblick	181
6	Zusammenfassung	184

7	Summary	186
8	Literaturverzeichnis	187
9	Anhang	200
A1	Probandeninformation	200
A2	Einverständniserklärung	201
A3	Allgemeiner Fragebogen	202
A4	Freiburger Fragebogen zur Bestimmung der körperlichen Aktivität	206
A5	Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI)-Fragebogen zur Bestimmung der Schlafqualität	207
A6	Epworth Sleepiness Scale (ESS)-Fragebogen zur Bestimmung der Tagesschläfrigkeit	211
A7	Deutsche Version des Morningness-Eveningness-Questionnaire (MEQ) zur Bestimmung des Chronotyps	212
A8	Seasonal Pattern Assessment Questionnaire (SPAQ) zur Bestimmung der Saisonalität	216
A9	Genarbeitsblatt <i>hBmal1</i>	220
A10	Genarbeitsblatt <i>hPer1</i>	222
A11	Genarbeitsblatt <i>h36B4</i>	224
A12	Genarbeitsblatt <i>hGAPDH</i>	225
A13	Genarbeitsblatt <i>hHPRT</i>	226
A14	Primerliste	227
A15	Durchgeführte Tests auf Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov	228
10	Danksagung	235
11	Erklärung	236

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ATP	Adenosin-Triphosphat
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaare (basepairs)
BRN	Basale retinale Neuronen
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca	circa
CAR	Cortisol-Aufwachreaktion (Cortisol awakening response)
CAU	Christian Albrechts Universität
cDNA	Komplementäre DNA (Complementary DNA)
CKIe	Casein kinase Ie
C _p	Crossingpoint
CRH	Corticotropin releasing hormone
CRSD	Schlafstörungen, die auf circadianen Störungen beruhen (circadian Rhythm Sleep Disorders)
C _t	Threshold-Cycle
d.h.	das heißt
dl	Deziliter
DLMO	Dim Light Melatonin Onset
D-MEQ	Deutsche Version des Morningness-Eveningness-Questionnaire
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Deoxynucleotid-Triphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA
DSPS	Syndrom der rückverlagerten Schlafphase (Delayed Sleep Phase Syndrome)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
ELISA	Der Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ESS	Epworth Sleepiness Scale
EtOH	Ethanol
FAM	Fluorescein
FASAP	Familiäres Syndrom der vorverlagerten Schlafphase (Familial Advanced Sleep Phase Syndrome)

Abkürzungsverzeichnis

G	Guanin
g	Gramm
g	Relative Zentrifugalbeschleunigung
gDNA	genomische DNA
GSS	Global Seasonality Score
<i>hBMAL1</i>	Humanes Brain and Muscle ARNT-like-Gen
HCL	Salzsäure
<i>hGAPDH</i>	Humanes Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Gen
<i>hHPRT</i>	Humanes Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyl Transferase-Gen
HPA-Axis	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (Hypothalamic Pituitary Adrenal Axis)
<i>hPER1</i>	Humanes Period Homolog 1-Gen
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HRP	Horse Radish Peroxidase
hRPLP0	Humanes Acidic Ribosomal Phosphoprotein P0
i.d.R.	In der Regel
IgG	Immunglobulin G
IQ	Intelligenz-Quotient
L	Liter
LED	Light Emitting Diode
LNA	Festgesetzte Nucleinsäuren (Locked Nucleic Acids)
Lsg.	Lösung
M	Mol
mA	Milliampere
max.	maximal
MEQ	Morningness-Eveningness-Questionnaire
MET	Metabolisches Äquivalent (metabolic equivalent)
min.	Minute
mind.	mindestens
mM	milliMol
mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA
MSH	Mundschleimhaut
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NREM	Non-Rapid-Eye-Movement
OD	Optische Dichte (optical density)

Abkürzungsverzeichnis

p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PBMCs	Mononucleäre Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells)
Prob.	Proband/in
PSQI	Pittsburgh Sleep-Quality-Index
r	Korrelationskoeffizient nach Pearson
RefSeq	Referenz-Sequenz (Reference Sequence)
REM	Rapid-Eye-Movement
RHT	Retino-Hypothalamischen-Trakt
RNA	Ribonucleinsäure
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
s.o.	Siehe oben
s.u.	Siehe unten
SCN	Suprachiasmatische Nuclei
sec	Sekunde
SNP	Einzelbasenaustausch (single nucleotide polymorphism)
sog.	sogenannte
SPAQ	Seasonal Pattern Assessment Questionnaire
ss	Single stranded (Einzelsträngig)
SWS	Slow-Wave-Sleep
T	Thymin
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
T_m	Melting-Temperature (Schmelztemperatur)
TMB	Tetramethylbenzidin
U	Uracil
u.a.	Unter anderem
u.U.	Unter Umständen
U/min	Umdrehungen pro Minute
UPL	Universal Probe Library
usw.	Und so weiter
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abb. Nr.	Titel der Abbildung	Seite
1.	Blumenuhr nach Carl von Linné.	3
2.	Neuronale Organisation circadianer Schrittmacher bei verschiedenen Tierstämmen.	5
3.	Lage der Suprachiasmatischen Nuclei im menschlichen Gehirn	7
4.	Schlaf- und Wachzeiten verschiedener Chronotypen und bei mutationsbedingter Verschiebung der Phasenlage	9
5.	24-Stunden-Diagramm der ungefähren Zeit im Tag-Nachtrhythmus, zu der verschiedene Krankheitsbilder beim Menschen verstärkt auftreten oder sich häufig verschlechtern	11
6.	Verlauf der Körpertemperatur an sieben verschiedenen Körperstellen.	12
7.	Schlafstadien des Menschen.	15
8.	Der Schlafzyklus des Menschen	16
9.	Die circadiane innere Uhr wird bei Mammalia durch negative Transkriptions-Translations-Rückkopplungsschleifen kontrolliert.	
10.	Circadianer Expressions-Verlauf der Gene <i>BMAL1</i> und <i>PER1</i> bei Mammalia	19
11.	Nebennierenrinde des Menschen	21
12.	Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (HPA)-Achse	22
13.	Patient mit Morbus Cushing	24
14.	Schema der Melatonin synthese	25
15.	Längsschnitt durch das menschliche Gehirn mit eingezeichneter Lage von Epiphyse, Thalamus und Corpus callosum	25
16.	Tag-Nachtverlauf der Melatonin-Konzentration im menschlichen Körper	26
17.	Digitale Thermometer zur Messung der oralen Körpertemperatur von Probanden	39
18.	SaliCap-Set zur Speichelsammlung	41
19.	Phasen einer PCR	51
20.	Der LightCycler.	54
21.	Funktionsprinzip von Hydrolysesonden	58
22.	Vergleich der Strukturformeln von LNA, DNA und RNA	59
23.	Teil eines UPL-Sonden-Assays mit Angabe der zu verwendenden Sonde sowie Informationen zu Primersequenzen und dem entstehenden Amplikon	61
24.	Standardkurve einer LightCycler-PCR	64
25.	Schematische Darstellung zum Nachweis, ob Haushaltsgene reguliert werden, oder nicht.	67
26.	Pipettierschema eines Cortisol-ELISAs	69
27.	Funktionsprinzip des verwendeten Cortisol-ELISAs	71
28.	Standardkurve eines Cortisol-ELISAs	72
29.	Standardkurve eines Melatonin-ELISAs	75
30.	Normalverteilung	80

31.	Streudiagramm mit Regressionsgeraden	84
32.	Standardkurven von Cortisol- und Melatonin-ELISA	86
33.	Einprozentiges Agarosegel mit elektrophoretisch aufgetrennter Gesamt-RNA	87
34.	Einprozentiges Agarosegel mit elektrophoretisch aufgetrennter cDNA	88
35.	Gelbilder der fünf in dieser Studie untersuchten Gene	89
36.	Fluoreszenzkurven einer Echtzeit-PCR auf dem LightCycler-Gerät	91
37.	Liste mit Crossingpoints nach einem LightCycler-Lauf mit 28 Ansätzen	92
38.	Standardkurve des Gens <i>humanes Brain and Muscle ARNT-like (hBMAL1)</i>	93
39.	Standardkurve des Gens <i>humanes Period Homolog 1 (hPER1)</i>	93
40.	Standardkurve des Gens <i>humanes Acidic Ribosomal Phosphoprotein P0 (h36B4)</i>	94
41.	Standardkurve des Gens <i>humane Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (hGAPDH)</i>	94
42.	Standardkurve des Gens <i>humane Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyl Transferase (hHPRT)</i>	94
43.	Vergleich der Expression von drei Haushaltsgenen bei jüngeren und älteren Frauen	96
44.	Vergleich der Expression von drei Haushaltsgenen bei älteren Männern und älteren Frauen.	97
45.	Vergleich der Expression von drei Haushaltsgenen um acht Uhr und um 20 Uhr. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ratios von drei weiblichen und einem männlichen Probanden	98
46.	Verlauf der Körperkerntemperatur bei zehn jüngeren und 20 älteren Probandinnen	116
47.	Unterschiede in der Schlafqualität von zehn jüngeren und 20 älteren Frauen	118
48.	Unterschiede in der Schlafdauer von zehn jüngeren und 20 älteren Frauen	117
49.	Vergleich des Aufstehzeitpunkts zwischen zehn jüngeren und 20 älteren Frauen	118
50.	Vergleich der Cortisol-Aufwachkonzentration bei zehn jüngeren und 20 älteren Frauen	119
51.	Vergleich der mittleren CAR-Konzentration bei jüngeren und älteren Probandinnen	120
52.	Vergleich der Cortisol-Morgenprofile von jüngeren und älteren Probandinnen	121
53.	Vergleich der Melatonin-Abendprofile von zehn jüngeren und 20 älteren Frauen	122
54.	Vergleich der mittleren DLMO-Werte von 20 älteren und zehn jüngeren Frauen	123
55.	Vergleich der Expressionsprofile des Uhrgens <i>hBMAL1</i> bei jüngeren und älteren Probandinnen	124
56.	Expressionsprofil von <i>hPER1</i> bei jüngeren und älteren Probandinnen	
57.	Vergleich der mittleren Körperkerntemperatur bei älteren 14 älteren Männern und 20 älteren Frauen	128
58.	Vergleich der Cortisol-Aufwach-Konzentrationen von 14 männlichen und 20 weiblichen älteren Probanden	130
59.	Vergleich der Cortisol-Morgenprofile von 14 älteren Männern und 20 älteren Frauen	131

60.	Vergleich der CAR-Werte von 14 männlichen und 20 weiblichen älteren Probanden	132
61.	Vergleich der abendlichen Melatonin-Konzentrationen bei 14 älteren Männern und 20 älteren Frauen	133
62.	Vergleich der mittleren DLMO-Werte von 14 älteren Männern und 20 älteren Frauen	134
63.	Vergleich des Expressionsprofils des Uhrengens <i>hBMAL1</i> von elf älteren Männern und 13 älteren Frauen	135
64.	Vergleich des Expressionsprofils des Uhrengens <i>hPER1</i> von zehn älteren Männern und 12 älteren Frauen	137
65.	Verlauf der Körperkerntemperatur bei älteren männlichen Probanden mit guter bzw schlechter Schlafqualität im Zeitraum von 8 Uhr bis 24 Uhr	141
66.	Verlauf der Körperkerntemperatur bei älteren guten und schlechten Schläferinnen im Zeitraum von 8 Uhr bis 24 Uhr	142
67.	Cortisol-Aufwachkonzentration bei guten und schlechten Schläfern	143
68.	Cortisol-Morgenprofile der männlichen Probanden unterteilt nach ihrer Schlafqualität	145
69.	Cortisol-Morgenprofile der weiblichen Probanden unterteilt nach ihrer Schlafqualität	146
70.	Vergleich der CAR-Werte bei guten und schlechten Schläfern	147
71.	Vergleich der Melatonin-Abendprofile von guten und schlechten Schläfern	149
72.	Vergleich der DLMO-Schwellenwerte von guten und schlechten Schläfern	151
73.	Vergleich des Expressionsprofils des Uhrengens <i>hBMAL1</i> von älteren guten und schlechten Schläfern	153
74.	Vergleich der Expressionsprofile des Uhrengens <i>hPER1</i> von Männern und Frauen mit guter bzw. schlechter Schlafqualität	155
75.	Zusammenhang zwischen Tagesschläfrigkeit und CAR bei zehn jüngeren und 20 älteren Frauen, sowie 14 älteren Männern	159
76.	Zusammenhang von Tagesschläfrigkeit und CAR bei neun älteren Männern mit guter Schlafqualität	160
77.	Zusammenhang zwischen CAR und der Körperkerntemperatur um acht Uhr morgens bei 20 älteren Frauen	161
78.	Zusammenhang zwischen Chronotyp und Schlafdauer bei 20 älteren Probandinnen	162
79.	Zusammenhang zwischen Chronotyp und Schlafdauer bei neun älteren Frauen mit guter Schlafqualität	163
80.	Zusammenhang zwischen CAR und Schlafdauer bei älteren Männern mit guter Schlafqualität	164
81.	Zusammenhang von Chronotyp und CAR bei zehn jüngeren Frauen	165

Tabellenverzeichnis

Tab. Nr.	Tabellentitel	Seite
1.	Beispiele für verschiedene Rhythmusdauern	1
2.	Übersicht über die bisher beim Menschen bekannten Uhrgene.	8
3.	Überblick über Messzeitpunkte und Probensammlungen am Probandentag	43
4.	Getestete RNA-Isolierungs Kits	44
5.	Getestete cDNA-Synthese Kits und deren Herstellerfirmen	48
6.	Standard-Rezept für einen 50 µl PCR-Ansatz	51
7.	Programm für eine Standard-PCR	52
8.	Übersicht über Anlagerungstemperaturen von Oligonukleotiden während Bkcycluser-PCR und LightCycler-PCR	52
9.	Übersicht über ein PCR-Programm, wie es auf dem LightCycler Anwendung findet	63
10.	Calibratorverdünnungsstufen und Anzahl der Replikate für die Erstellung von Standardkurven	64
11.	Konzentrationen der Cortisol-Standards und –Kontrollen aus dem Cortisol ELISA-Kit	70
12.	Konzentrationen der Melatonin-Standards und -Kontrollen	73
13.	Einteilungen, Sprachgebrauch und Symbolisierung der Irrtumswahrscheinlichkeit p	79
14.	Korrelations-Grenzen und Begriffe	82
15.	PCR-Effizienzen von Echtzeit-PCRs für Ziel- und Haushaltsgene	89
16.	Vergleich der Ratios von <i>hBMAL1/h36B4</i> zwischen zwei PCR-Läufen von drei Probandinnen mit jeweils sechs Proben	99
17.	Übersicht über die fünf mittleren Variationskoeffizienten der Ratios von <i>hBMAL1/h36B4</i> für sechs verschiedene Zeitpunkte	100
18.	Anzahl und mittleres Alter der Studienteilnehmer	100
19.	Anthropometrische Merkmale der Probanden	101
20.	Wohnsituation der Studienteilnehmer	101
21.	Beschäftigungssituation der Probanden	102
22.	Selbstbeurteilung des Gesundheitszustands der Probanden	102
23.	Das Rauchverhalten der Probanden	103
24.	Wöchentlicher Kaffee-/Tee- und Alkoholgenuss der Studienteilnehmer	103
25.	Medikamenteneinnahme der Probanden	104
26.	Hormonersatztherapie und Einnahme von oralen Kontrazeptiva der Probandinnen	104
27.	Zeit, die im Mittel von den Probanden im Freien verbracht wird	105
28.	Verteilung der körperlichen Aktivität der Probanden	105
29.	Chronotypen-Verteilung der Probanden nach Fragebogenbefund	106
30.	Chronobiologische Extremtypen nach Fragebogenauswertung	106
31.	Aufteilung der Probanden in gute und schlechte Schläfer	107

Tabellenverzeichnis

32.	Schlafmerkmale der Studienteilnehmer nach Fragebogenauswertung	108
33.	Die Tagesschläfrigkeit der Probanden	109
34.	Anzahl der Probanden mit bzw. ohne jahreszeitliche Depression (SAD)	109
35.	Verlauf der Körperkerntemperatur in drei Probandengruppen über 16 Stunden	110
36.	Mittelwerte und Standardabweichungen für das Cortisol-Morgenprofil der Probanden	111
37.	CAR-Werte von drei Probandengruppen	112
38.	Verlauf der Melatonin-Konzentrationen im Zeitraum von 17 bis 24 Uhr bei drei Probandengruppen	112
39.	DLMO-Schwelle sowie Zeitpunkt des DLMOs	113
40.	Expression der Uhrengene <i>hBMAL1</i> und <i>hPER1</i>	114
41.	Gruppenvergleiche des tageszeitlichen Körperkerntemperatur-Verlaufs von zehn jüngeren und 20 älteren Frauen	116
42.	Gruppenvergleiche von fünf Variablen, die mit Hilfe des PSQI-Fragebogens von zehn jüngeren und 20 älteren Frauen ermittelt wurden	118
43.	Gruppenvergleiche von Cortisol-Morgenprofil mit Cortisol-Aufwachkonzentration (0 min) und CAR-Wert von zehn jüngeren und 20 älteren Frauen	119
44.	Gruppenvergleiche von Melatonin-Abendprofilen und DLMO-Schwellenwert sowie DLMO-Zeitpunkt von zehn jüngeren und 20 älteren Frauen	122
45.	Gruppenvergleiche des Expressionsprofils des Uhrengens <i>hBMAL1</i> von zehn jüngeren und 13 älteren Frauen (Zeitpunkte 8, 12, 16 und 20 Uhr)	125
46.	Gruppenvergleiche des Expressionsprofils des Uhrengens <i>hBMAL1</i> von zehn jüngeren und 13 älteren Frauen (Zeitpunkte 22 und 24 Uhr)	125
47.	Gruppenvergleiche der Expressionsprofile des Uhrengens <i>hPER 1</i> von zehn jüngeren und 12 älteren Frauen	126
48.	Gruppenvergleiche im tageszeitlichen Körpertemperatur-Verlauf von 14 älteren Männern und 20 älteren Frauen	128
49.	Gruppenvergleiche von fünf Variablen, die mit Hilfe des PSQI-Fragebogens von 14 älteren Männern und 20 älteren Frauen ermittelt wurden	129
50.	Mittelwertvergleiche von Cortisol-Morgenprofil, Cortisol-Aufwachkonzentration (0 min) und CAR-Wert von 14 älteren Männern und 20 älteren Frauen mit dem t-Test für unabhängige Stichproben	130
51.	Mittelwertvergleiche des Melatonin-Abendprofils von 14 älteren Männern und 20 älteren Frauen	133
52.	Mittelwertvergleiche des DLMOs von 14 älteren Männern und 20 älteren Frauen	134
53.	Gruppenvergleiche des Expressionsprofils des Uhrengens <i>hBMAL 1</i> von elf älteren Männern und 13 älteren Frauen	136
54.	Gruppenvergleiche der Expressionsprofile des Uhrengens <i>hBMAL 1</i> von elf älteren Männern und 13 älteren Frauen	136
55.	Gruppenvergleiche der Expressionsprofile des Uhrengens <i>hPER 1</i> von zehn	137

Tabellenverzeichnis

	älteren Männern und 12 älteren Frauen	
56.	Körperliche Aktivität von guten und schlechten Schläfern	138
57.	Gruppenvergleiche zwischen der körperlichen Aktivität von guten und schlechten Schläfern	139
58.	Körperkerntemperatur-Verläufe von älteren Probanden mit unterschiedlichen Schlafqualitäten	140
59.	Vergleich des Verlaufs der Körperkerntemperatur von guten und schlechten Schläfern	142
60.	Mittelwert und Standardabweichung der Cortisol-Aufwachkonzentration bei guten und schlechten Schläfern	143
61.	Mittlere morgendliche Cortisol-Konzentrationen von älteren Männern und Frauen mit guter bzw. schlechter Schlafqualität innerhalb der ersten 60 min. nach dem Erwachen	144
62.	Vergleich der mittleren Cortisol-Konzentrationen während der ersten 60 min. nach dem Aufwachen von Männern und Frauen mit guter bzw. schlechter Schlafqualität.	146
63.	Vergleich der Cortisol-Awakening-Response (CAR) von guten und schlechten Schläfern	147
64.	Mittelwert-Vergleich der CAR-Werte von guten und schlechten Schläfern	148
65.	Vergleich der abendlichen Melatonin-Konzentrationen von guten und schlechten Schläfern	149
66.	Vergleich der mittleren Melatonin-Konzentrationen von guten und schlechten Schläfern in den Gruppen ältere Männer und ältere Frauen	150
67.	DLMO-Schwellenwert und DLMO-Zeitpunkt von guten und schlechten Schläfern	150
68.	Vergleich der Mittelwerte von DLMO-Schwellenkonzentration und DLMO-Zeitpunkt bei guten und schlechten Schläfern	152
69.	Mittelwerte der Ratios von <i>hBMAL1</i> / <i>h36B4</i> mit Standardabweichungen bei älteren Probanden mit guter bzw. schlechter Schlafqualität	152
70.	Vergleich der mittleren Expressionsrate von <i>hBMAL1</i> bei guten und schlechten Schläfern	154
71.	Mittelwerte der Ratios von <i>hPER1</i> / <i>h36B4</i> mit Standardabweichungen bei guten und schlechten Schläfern	154
72.	Gruppenvergleiche des Expressionsprofils des Uhrengens <i>hPER1</i> bei älteren männlichen und weiblichen Probanden mit guter bzw. schlechter Schlafqualität	155
73.	Korrelationskoeffizienten zwischen der Körperkerntemperatur zu verschiedenen Uhrzeiten, der mittleren Körperkerntemperatur sowie der Tages-Temperatur-Differenz mit dem körperlichen Aktivitätsgrad bei 14 älteren Männern	156
74.	Korrelation zwischen der Körperkerntemperatur zu verschiedenen Uhrzeiten, der mittleren Körperkerntemperatur sowie der Tages-Temperatur-Differenz mit dem körperlichen Aktivitätsgrad von 20 älteren Frauen	157
75.	Korrelation zwischen der Körperkerntemperatur zu verschiedenen Uhrzeiten, der	157

Tabellenverzeichnis

	mittleren Körperkerntemperatur sowie der Tages-Temperatur-Differenz mit dem körperlichen Aktivitätsgrad von 10 jüngeren Frauen	
76.	Korrelationskoeffizienten zwischen CAR und Tagesschläfrigkeit bei drei Probandengruppen	158
77.	Korrelation zwischen CAR und Tagesschläfrigkeit bei guten und schlechten Schläfern	159
78.	Korrelation zwischen CAR und Körperkerntemperatur um acht Uhr in drei Probandengruppen	161
79.	Korrelationskoeffizienten zwischen Chronotyp und Schlafdauer bei drei Probandengruppen	162
80.	Korrelationskoeffizienten von Chronotyp und Schlafdauer bei guten und schlechten Schläfern	163
81.	Zusammenhang zwischen CAR und Schlafdauer bei guten bzw. schlechten Schläfern	164
82.	Zusammenhang von Chronotyp und CAR in drei Probandengruppen	165

1 Einleitung

1.1 Chronobiologie

Obwohl oft unbemerkt ablaufend, weil als selbstverständlich angenommen, spielen Rhythmen eine große und ständige Rolle in der Biologie. Sie kommen bei fast allen Lebewesen, von Einzellern über Pilze und Pflanzen bis hin ins Tierreich, vor (Dunlap 1993, Takahashi 1995) und beziehen sich auf die verschiedensten Bereiche. So findet man Zyklen auf biochemischer und physiologischer Ebene genauso wie im Verhalten von Lebewesen (Phillips 2009). Die Dauer dieser Rhythmen kann jedoch sehr unterschiedlich sein. Sie reicht von Sekundenbruchteilen bis hin zu Jahren (Tab. 1).

Tab. 1: Beispiele für verschiedene Rhythmusdauern

Begriff	Zeitbereich	Beispiel
----- --	Millisekunden- bis Sekundenbereich	Repetitive Nervenimpulse
----- --	Minutenbereich	Herzschlag des Menschen, Glykolysekaskaden
ultradian	<16 Stunden	Körperkerntemperatur des Menschen
circatidal	im Rhythmus der Gezeiten	Aktivität von Muscheln und Limulus
circadian	etwa 24 Stunden (16 bis 32 Stunden)	Müdigkeitsgefühl des Menschen
circalunar	monatlich	Weiblicher Menstruationszyklus
saisonal	im Wandel der Jahreszeiten	Blattentwicklung und -färbung der Pflanzen
circannual	jährlich	Vogelzug

Mit dem Begriff „Chronobiologie“ wird der Forschungsbereich bezeichnet, der sich mit den endogenen, in Lebewesen rhythmisch ablaufenden biologischen Prozessen befasst.

„Ein Rhythmus ist gegeben durch die identische Wiederholung der zeitlichen Abfolge von Änderungen einer Variablen.“ (Fleissner 1996) Je nachdem, in welchem Zeitrahmen sich die Rhythmen abspielen, sind entweder membrangebundene und cytoplasmatische Regelprozesse (Millisekunden- bis Minutenbereich), oder kerngebundene Rückkopplungen in der Proteinbiosynthese (längere Rhythmen) für die Reaktionskaskaden verantwortlich (Fleissner 1996). Um einen endogenen oder endogen generierten Rhythmus handelt es sich dann, wenn der Rhythmus mit etwa der gleichen Dauer aufrecht erhalten wird, auch wenn

das Individuum von äußeren Hinweisen auf die Uhrzeit isoliert ist (free-running state) (Refinetti und Menaker 1991). Die meisten chronobiologischen Forschungsarbeiten befassen sich mit der circadianen Rhythmik.

1.2 Circadiane Rhythmik

Auch bei circadianen (circa = lat. etwa, dies = lat. Tag) Rhythmen handelt es sich um endogen generierte Rhythmen. Diese haben eine Dauer von etwa 24 Stunden. Als „etwa 24 Stunden“ wird meist eine Zeitspanne von 16 bis 32 Stunden angesehen (Refinetti und Menaker 1991). Sie werden immer wieder mit der exogenen Periodik synchronisiert (Entrainment). Ein exogener Reiz, der von dem Organismus sensorisch wahrgenommen wird, und der zu einer Angleichung der endogenen Rhythmik an die Umwelt führt, wird Zeitgeber genannt. Die Hell-Dunkel-Periodik auf der Erde dürfte einer der bedeutendsten exogenen Faktoren sein, der das Leben beeinflusst. Er ist auch der wirkungsvollste Zeitgeber für die circadiane Rhythmik. Circadiane Rhythmen werden deshalb auch definiert als „vorhersagbare tägliche Variationen von Parametern, die mit dem täglichen Hell-/Dunkelzyklus verknüpft sind“ (Moyes und Schulte 2008). Die circadiane Rhythmik findet sich in allen Phyla, also bei einzelligen und vielzelligen Organismen, bei Pflanzen und Tieren, und somit natürlich auch beim Menschen (Bünning 1963). Die Tatsache, dass sich eine Eigenschaft evolutiv über sämtliche Phyla erhalten hat, deutet bereits auf ihre enorme Wichtigkeit hin. Dass sich eine circadiane Rhythmik überhaupt entwickelt hat, könnte daran liegen, dass die Evolution von Organismen auf der Erde begann, als das Sonnenlicht einen noch wesentlich höheren Anteil an ultravioletter Strahlung hatte. Durch die Verlagerung der aktiven Phase in nächtliche Stunden könnten Organismen einen Selektionsvorteil gehabt haben (Pittendrigh 1993). Andererseits kann es für Beutetiere eines tagaktiven Beutegreifers durchaus von Vorteil sein, wenn ihre aktive Phase nachts ist, und sie den Tag in geschützten Behausungen verbringen können.

Die wahrscheinlich ersten schriftlich festgehaltenen Forschungsergebnisse zur circadianen Rhythmik stammen aus der Botanik. 1729 stellte der französische Astronom Jean Jaques d'Ortous de Mairan fest, dass die Blätter von Mimosen sich auch im Dauerdunkel ungefähr tagesrhythmisch öffnen und schließen. Im Jahre 1745 erstellte Carl von Linné seine Blumenuhr (Abb. 1). Hierbei handelt es sich um eine zeigerlose Uhr. Auf ihrem Zifferblatt sind Blumen abgebildet, und zwar gezeichnet innerhalb der Stunde, während der sich die Blüten der jeweiligen Pflanze öffnen oder schließen. Um auf die momentane Uhrzeit rückschließen zu können, muss man also den Öffnungszustand der Blüten der umgebenden Pflanzen mit der Stunde abgleichen, zu der der jeweilige Öffnungszustand dieser Blüten auf der Blumenuhr dargestellt ist.



Abb. 1: Blumenuhr nach Carl von Linné. Der Öffnungszustand der umgebenden Blüten kann mit der Uhr abgeglichen werden, und dadurch auf die Uhrzeit zurückgeschlossen werden (URL [1])

Diese Uhr setzt indirekt voraus, dass Pflanzen in der Lage sind, Informationen über den zeitlichen Verlauf eines Tages zu registrieren, zu verarbeiten, und dementsprechend zu reagieren. Die Anpassung eines Organismus' an die circadiane Rhythmik der Umwelt erlaubt es ihm, „vorausschauend“ zu agieren. Die rhythmische Mobilisierung einer bestimmten Reaktionsbereitschaft ermöglicht es einem Organismus, sich rechtzeitig, und deshalb effizient, auf periodisch wiederkehrende Ereignisse vorzubereiten (Antizipation). Hierdurch kann er schneller und besser auf das Ereignis reagieren. Auf solche Fähigkeiten muss infolgedessen ein evolutiver Druck wirken, der vererbare Rhythmicitäten herauszucht (Fleissner 1996). Antizipatorisches Verhalten findet man bei Pflanzen und Tieren. Viele Pflanzen aktivieren ihren Photosyntheseapparat bereits kurz vor dem Sonnenaufgang. Dies ermöglicht ihnen eine besonders effektive Nutzung des Sonnenlichts, da so quasi jede Minute der Lichteinstrahlung genutzt werden kann. Auch das Öffnen der Blüten geschieht, wie oben erwähnt, bei vielen Pflanzen im circadianen Rhythmus. Eine zeitliche Anpassung der Aktivität von bestäubenden Insekten und Blüten-Öffnungszeitpunkt der Pflanzen aneinander gewährleistet einen effektiven Bestäubungsvorgang. Bei Pflanzen ist kein übergeordnetes Zentrum bekannt, von dem ausgehend die endogene circadiane Rhythmik gesteuert wird.

Die Erforschung von circadianen Rhythmen in der Zoologie begann im 20. Jahrhundert. Hier sind beispielsweise die Forschungen von Erwin Bünning, Jürgen Aschoff und Colin

Pittendrigh zu nennen. 1958 veröffentlichte Erwin Bünning sein Werk „Die physiologische Uhr“. Die zweite Auflage von 1963 erhielt zusätzlich den Untertitel „Zeitmessung in Organismen mit ungefähr tagesperiodischen Schwingungen“ (Bünning 1963). Dieses Buch dürfte das erste umfassende Werk zum Thema innere Uhr bzw. circadiane Rhythmik gewesen sein. Jürgen Aschoff war der erste, der die circadiane Forschung auf den Menschen übertrug. So stellte er 1955 fest, dass die Körperkerntemperatur des Menschen einer circadianen Rhythmik unterliegt (Aschoff 1955). Davon ausgehend stellte er weitere Studien am Menschen an. Am berühmtesten sind wahrscheinlich seine Bunkerexperimente, bei denen Menschen drei bis vier Wochen in kompletter Isolation, abgeschirmt von anderen Menschen und äußeren Reizen wie Geräuschen oder Tageslicht, in einem Bunker bei Andechs lebten. Während dieser Experimente stellte er fest, dass die Freilaufperiode der meisten Menschen etwa 25 Stunden beträgt (Aschoff 1965).

Die bereits erwähnte große Bedeutung des 24-Stunden-Zyklus wurde 1971 in einer Studie von Aschoff und 1972 von Pittendrigh in jeweils einem Experiment mit Fliegen demonstriert. Beide zeigten, dass die Lebensdauer von Fliegen dramatisch verkürzt ist, wenn man sie einem anderen als dem 24-Stunden-Rhythmus aussetzt (Pittendrigh und Minis 1972) bzw. die circadiane Rhythmik über einen längeren Zeitraum hinweg wiederholt stört (Aschoff et al. 1971). Pittendrigh schloss daraus, dass eukaryote Systeme am effektivsten funktionieren, wenn sie in ihrem natürlichen, also dem circadianen, Rhythmus leben können.

Die innere Hauptuhr (Schrittmacher) im Körper von Tieren, die für die Aufrechterhaltung des 24-Stunden-Rhythmus verantwortlich ist, ist eine übergeordnete Struktur, die anderen Strukturen im Körper ihren Rhythmus aufzwingt. Sie ermöglicht dadurch den abgestimmten zeitlichen Verlauf von Vorgängen im Körper. Der physiologische Sitz dieser inneren Uhr konnte für verschiedene Tierstämme nachgewiesen werden. Hierbei war die marine Schnecke *Aplysia californica* das erste Metazoon, bei dem ein circadianes Schrittmacherzentrum gefunden wurde (Block et al. 1982). Der Schrittmacher befindet sich meist in räumlicher Nähe zum Sehsystem und wird häufig als „Sitz der inneren Uhr“ bezeichnet (Fleissner 1996). Oft handelt es sich bei diesen inneren Uhren anatomisch betrachtet um eine relativ kleine Ansammlung von Zellen, von denen in regelmäßigen Abständen Signalkaskaden ausgehen. Diese Strukturen haben einen enormen Einfluss auf die Körperfunktionen, da sie als Rhythmusgeneratoren am Anfang einer ganzen Signalkette stehen. Das Schrittmacherzentrum befindet sich bei Arthropoden wie Insekten und Crustacea in den optischen Loben (Fleissner und Heinrichs 1982, Maciel et al. 2008) bei Mollusken in basalen retinalen Neuronen (BRN) an der Basis der Retina (Block et al. 1982, Michel et al. 1993), und bei Mammalia über der Kreuzung der Sehnerven in den paarig

angelegten Suprachiasmatischen Nuclei (SCN) und /oder der Epiphyse (Pinealorgan, Zirbeldrüse) (Abb. 2).

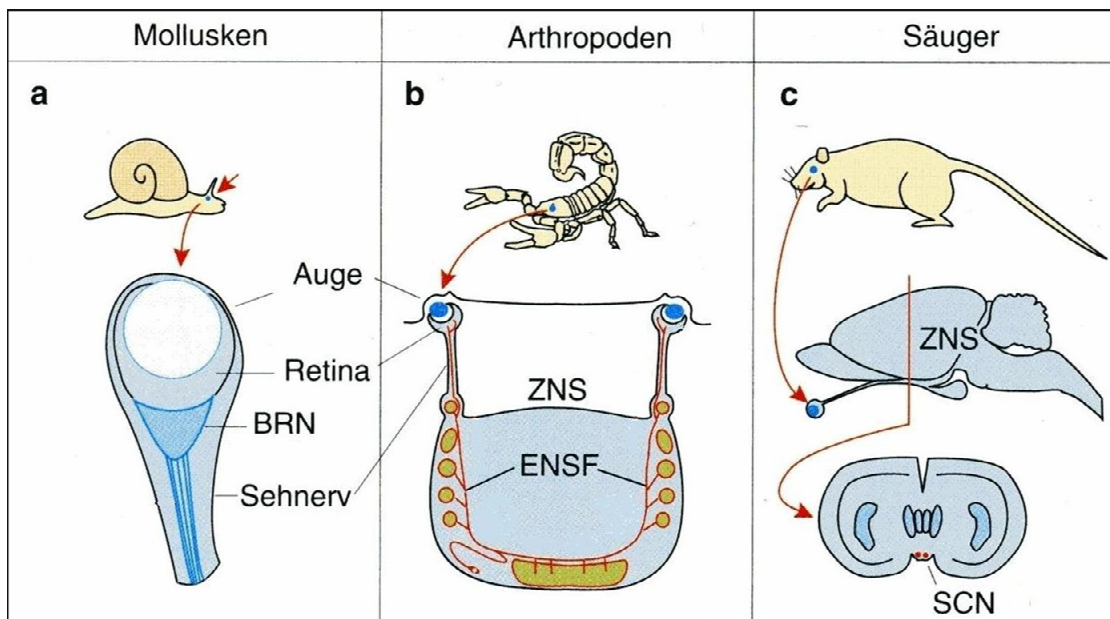


Abb. 2: Neuronale Organisation circadianer Schrittmacher bei verschiedenen Tierstämmen. **a)** Mollusken besitzen etwa 100 basale retinale Neuronen. Sie bilden Aktionspotentiale, die vom Sehnerv begleitet werden. **b)** Bei Arthropoden ist bisher nur ein einziges Schrittmachenneuron nachgeordnetes Netzwerk von efferenten neurosekretorischen Fasern bekannt, das circadiane Signale an Effektoren (wie z.B. die Augen) verteilt. Die Fasern haben Kontakt zu den optischen Loben und dem Zentralkörper (grün) im ZNS. **c)** Bei Säugern befinden sich die Schrittmachenneurone im Suprachiasmatischen Nucleus. Hier gibt es über Nervenbahnen ebenfalls eine Verbindung zum Auge bzw. der Retina. BRN = Basale Retinale Neuronen; ENSF = efferente neurosekretorische Fasern; SCN = Suprachiasmatische Nuclei; ZNS = Zentrales Nervensystem. (Verändert nach Fleissner 1996, S. 528)

Bei den meisten Wirbeltieren, die keine Säuger sind, ist die innere Uhr mit der Epiphyse assoziiert. Unter anderem wird hier das Hormon Melatonin produziert. Bei Fischen, Amphibien, Reptilien und Vögeln liegt die Epiphyse nicht tief im Gehirn, sondern diese Struktur befindet sich dorsal dicht am Schädelknochen und ist lichtempfindlich. Bei einigen Arten ist der Schädel an dieser Stelle so dünn, dass Licht ihn durchdringen, und direkt auf die Epiphyse fallen kann. Bei manchen ausgestorbenen Wirbeltierarten fungierte das Pinealorgan offenbar als drittes Auge mit einer Linse zur Lichtbündelung (Moyes und Schulte 2008). Bei den rezenten Säugetieren erhalten die SCN über das Auge Informationen über die den Organismus umgebende Lichtstärke. Hierbei liegen die Rezeptoren für die Lichtstärke nicht in den Sehzellen, also den Stäbchen und Zapfen, sondern in sog. retinalen Ganglienzellen. Das Pigment, das in den retinalen Ganglienzellen für die Aufnahme des Lichts verantwortlich ist, ist das blaulichtsensitive Melanopsin (Gooley et al. 2010, Hattar et al. 2002, Panda et al. 2002), das strukturell mit dem Sehpurpur, den Opsinen, verwandt ist. Wenn Licht auf die retinalen Ganglienzellen des Auges fällt, wird das Signal über retinohthalmischen Trakt bis zu den SCN weitergeleitet. Von den SCN gehen dann

hormonelle Signale aus, die dazu führen, dass beispielsweise die Expression von Genen herauf- oder heruntergeregelt wird (Phillips 2009).

Die molekularbiologische Forschung an circadianen Rhythmen begann vor mehreren Jahrzehnten. So wurde 1971 das Gen „Period“ in der Fliege *Drosophila melanogaster* entdeckt (Konopka und Benzer 1971). Hierbei handelte es sich um das erste Uhrengen, das bei Tieren entdeckt wurde. Bei Uhrengenen handelt es sich um Gene, deren Genprodukte zur Aufrechterhaltung von zeitlich rhythmisch ablaufenden Vorgängen im Körper beitragen. 1988 fanden Ralph und Menaker eine Mutation bei Hamstern, die zu einer drastischen Verkürzung der circadianen Phase führt. Sie nannten diese Mutation nach dem griechischen Symbol für die Periodenlänge eines Rhythmus „tau“ (Ralph und Menaker 1988). Im Jahre 1994 entdeckte eine Forschergruppe um Vitaterna in Mäusen das Gen „Clock“ (Vitaterna et al. 1994). Bereits im Jahr 1997 fanden zwei Gruppen unabhängig voneinander das menschliche Homolog zum *dPer*-Gen, nannten es aber unterschiedlich. Die Gruppe um Sun nannte das Gen *RIGUI* (Sun et al. 1997), und die Gruppe um Tei nannte es *hPER1*. In der selben Studie, in der Tei et al. 1997 die Entdeckung des menschlichen Homologs veröffentlichten, gaben sie ebenfalls bekannt, auch ein Homolog zum *dPer*-Gen in Mäusen gefunden zu haben. Zwei weitere homologe Gene zum *dPer*-Gen wurden 1997 bzw. 1998 im Maus-Genom entdeckt (Shearman et al. 1997, Zylka et al. 1998). In den weiteren Jahren erfolgten immer weitere Entdeckungen, die sich auch auf das Zusammenspiel von Genprodukten bezogen (Yagita et al. 2000). Im Laufe der Zeit wuchs die Erkenntnis, dass die Aufrechterhaltung von circadianen Rhythmen bei Säugern auf autoregulatorischen negativen Rückkopplungsschleifen beruht. Hierbei regulieren Genprodukte ihre eigene Expression in einem 24 Stunden-Rhythmus über Transkriptions- Translations- Rückkopplungsschleifen (Yagita et al. 2000, Dunlap 1999, Reppert und Weaver 2001, Maywood et al. 2003). Außerdem stellte man fest, dass es außer der Hauptuhr in den SCN bei Säugern weitere circadiane Uhren in peripheren Geweben wie der Leber (Yoo et al. 2004) und der Haut (Zanello et al. 2000) gibt.

Die Bedeutung circadianer Rhythmen erhält sowohl in der Forschung als auch im sozialen und politischen Leben eine zunehmende Bedeutung. Dies äußert sich beispielsweise darin, dass am 01.01.2006 das Projekt „EUCLOCK“ ins Leben gerufen wurde. Hierbei handelt es sich um ein von der Europäischen Kommission unterstütztes Projekt mit einem Budget von etwa 16.000.000 €. Innerhalb von fünf Jahren sollen europaweit Erkenntnisse zur circadianen Rhythmik bei Fliegen, Mäusen und Menschen gewonnen werden (URL [2]).

Circadiane Rhythmik des Menschen

Auch für den Menschen wurde bereits für viele verschiedene Körperfunktionen nachgewiesen, dass sie einer circadianen Rhythmik unterliegen. Hierzu zählen z.B. die

Einleitung

Körperkerntemperatur, das Schlafverhalten, die Ausschüttung verschiedener Hormone und die Expression diverser Gene. Aschoff vermutete sogar, dass es kein Organ und keine Funktion im Körper des Menschen gebe, die nicht der circadianen Rhythmik unterliege (Aschoff 1965).

Bezüglich der circadianen Rhythmik des Schlafverhaltens unterscheidet man zwischen drei verschiedenen Chronotypen: Abendtypen oder „Eulen“, Morgenmenschen oder „Lerchen“ und Intermediärtypen. Morgenmenschen gehen früh ins Bett, haben ihr physiologisches Leistungshoch eher früh am Tag und werden auch früh wieder müde. Bei Abendmenschen ist dies genau andersherum.

Wenn sich Menschen unter konstanter Beleuchtung befinden und es ihnen nicht möglich ist, anhand von äußeren Hinweisen auf die derzeitige Uhrzeit zu schließen (free running condition), weisen sie meist einen endogenen Zyklus auf, der nicht genau 24 Stunden entspricht, sondern meist eher 25 Stunden lang ist (Aschoff 1967, Weitzman 1982). Die Aufrechterhaltung dieses endogenen Zyklus wird gesteuert durch die SCN im Gehirn des Menschen, die wie bei anderen Mammalia auch, als paarige Struktur oberhalb der Sehnervenkreuzung (Chiasma opticum) liegen (Abb. 3). Die SCN bestehen beim Menschen aus zweimal etwa 10.000 Zellen und sind annähernd reiskorn groß (Fleissner 1996).

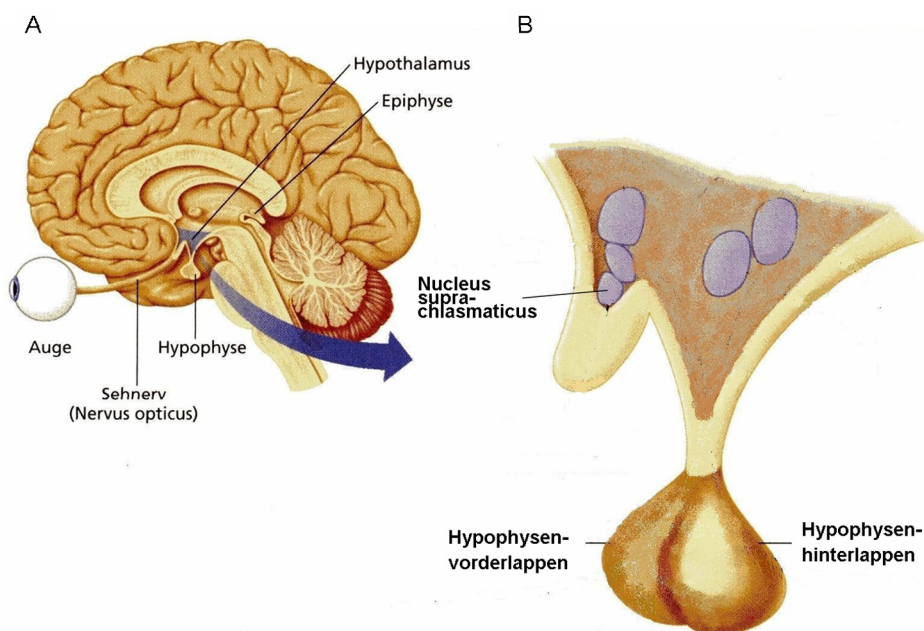


Abb. 3: Lage der Suprachiasmatischen Nuclei im menschlichen Gehirn (verändert nach: Moyes und Schulte 2008, S. 327)

In den letzten Jahren wurde die Erforschung von circadianen Rhythmen vermehrt auch am Menschen betrieben. Hier sind bisher die in Tabelle 2 aufgeführten Uhrengene bekannt (Cermakian und Sassone-Corsi 2000, Young und Kay 2001).

Tab. 2: Übersicht über die bisher beim Menschen bekannten Uhrengene. Angegeben sind jeweils der volle Name und die allgemein verwendete Abkürzung

Ausgeschriebener Name	Abkürzung
Humanes <i>Brain and Muscle ARNT-like 1</i>	<i>hARNTL</i> bzw. <i>hBMAL1</i>
Humanes <i>Brain and Muscle ARNT-like 2</i>	<i>hBMAL2</i>
Humanes <i>Circadian Locomotor Output Cycles Kaput</i>	<i>hCLOCK</i>
Humanes <i>Cryptochrom</i>	<i>hCRY</i>
Humanes <i>Period-like 1</i>	<i>hPER1</i>
Humanes <i>Period-like 2</i>	<i>hPER2</i>
Humanes <i>Period-like 3</i>	<i>hPER3</i>
Humanes <i>Timeless</i>	<i>hTIM</i>
Humane <i>Caseinkinase 1ε</i>	<i>hCkl ε</i>

Hierbei lag das Augenmerk hauptsächlich auf der Erforschung von genetischen Grundlagen und Zusammenhängen zwischen circadianer Rhythmik und Krankheiten. Mittlerweile wurde in der Medizin die Klassifizierung sog. "circadian Rhythm Sleep Disorders (CRSD) (Rahman et al. 2010) eingeführt. Einen Zusammenhang zwischen einem Einzelbasenaustausch (single nucleotide polymorphism, SNP) im *hCLOCK*-Gen konnten Katzenberg et al. 1998 damit in Verbindung bringen, ob eine Person ein Morgen- oder Abendmensch ist. Das „Familiäre Syndrom der vorverlagerten Schlafphase“ (Familial Advanced Sleep Phase Syndrome, FASAP) war die erste Krankheit, für die ein genetischer Zusammenhang zwischen einem Uhrengen und einer Krankheit nachgewiesen wurde, bei der die circadiane Rhythmik von Patienten beeinträchtigt ist (Jones et al. 1999). FASAP ist dadurch gekennzeichnet, dass mehrere Individuen einer Familie extreme Morgenmenschen sind. Diese Personen werden sehr früh müde und wachen sehr früh wieder auf. Ein Leben in unserer sozialen Umwelt wird dadurch stark erschwert. Jones et al. konnten 1999 in einer Studie erstmals zeigen, dass es sich bei dieser Krankheit um eine autosomal dominant vererbare, und somit genetisch bedingte, Erkrankung handelt. In ihrer Vergleichsstudie untersuchten sie zwölf Familienmitglieder, von denen sechs als FASPS-Patienten diagnostiziert waren und sechs gesund waren. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die Schlafphase der Patienten im Vergleich zu derjenigen der Gesunden im Mittel um vier Stunden vorverlagert war. Die Patienten schliefen demnach gegen 19:25 Uhr ein und wachten gegen 04:18 Uhr wieder auf (Jones et al. 1999). Außerdem zeigte sich, dass auch die Periodenlänge der Patienten auf etwa 23,3 Stunden verkürzt war. Nachdem Jones et al.

in ihrer Studie den Nachweis erbracht hatten, dass es eine genetische Ursache für die Krankheit FASPS gibt, konnten Toh et al. Im Jahre 2001 zeigen, dass es sich bei dem krankheitsauslösenden Faktor um eine Missense-Mutation im humanen *Period2*-Gen (*hPER2*) handelt. Die Mutation führt dazu, dass in der Aminosäuresequenz des Genprodukts ein Glycin statt eines Serins vorhanden ist. Hierdurch wird die Bindestelle des Enzyms Caseinkinase Iε (CKIε) beeinträchtigt, und eine Hypophosphorylation ist die Folge (Toh et al. 2001). In einer weiteren Studie konnte außerdem eine Mutation im *CKIδ*-Gen mit der Krankheit in Verbindung gebracht werden (Xu et al. 2005)

So wie es das Syndrom der vorverlagerten Schlafphase gibt, gibt es auch eine Erkrankung, bei der die Schlafphase zeitlich extrem nach hinten verlagert ist. Das „Syndrom der rückverlagerten Schlafphase“ (Delayed Sleep Phase Syndrome, DSPS) wurde 1981 erstmalig beschrieben (Weitzman et al. 1981). Bei dieser Krankheit sind die Patienten extreme „Eulen“, die erst wesentlich später einschlafen und wieder aufwachen, als es bei der Durchschnittsbevölkerung der Fall ist (Abb. 4). Auch mit dieser Erkrankung konnten bisher Mutationen in zwei Genen in Verbindung gebracht werden. Archer et al. (2003) stellten einen Zusammenhang zwischen einem Längenpolymorphismus im *hPER3*-Gen und dieser Krankheit her. Im darauffolgenden Jahr wurde eine Mutation im Caseinkinase Iε-Gen mit dieser Krankheit in Verbindung gebracht (Takano et al. 2004).

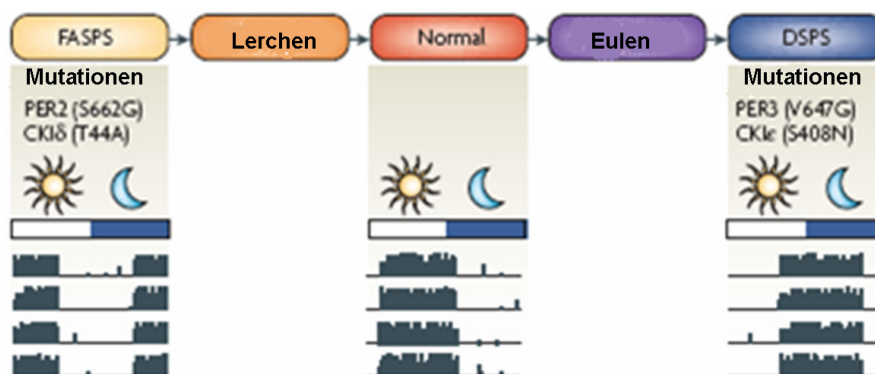


Abb. 4: Schlaf- und Wachzeiten verschiedener Chronotypen und bei mutationsbedingter Verschiebung der Phasenlage (verändert nach: Gallego 2007). Die Normaltypen werden flankiert von den „Eulen“ und „Lerchen“, die Spät- bzw. Frühtypen entsprechen. Im Falle der Krankheit FASP sind Schlaf- und Wachphase noch weiter in die frühen Stunden verschoben, als bei den Lerchen. Im Falle der Krankheit DSPS sind die Schlaf- und Wachphasen der Patienten noch weiter nach hinten verlagert als bei Spättypen bzw. Eulen.

Auch Zusammenhänge zwischen verschiedenen Krebsarten und veränderten circadianen Rhythmen wurden mittlerweile in diversen Studien aufgezeigt (Hansen 2001, Klevecz et al. 1987, Kubo et al. 2006, Schernhammer et al. 2003, Viswanathan et al. 2007). Mit den Veränderungen im circadianen Rhythmus sind hierbei nicht unbedingt genetisch bedingte Ursachen gemeint, sondern hauptsächlich selbst herbeigeführte. So ist durch die

zunehmende Elektrifizierung und Industrialisierung die Tendenz zu Schichtarbeit und damit verbundenen Nachtschichten verstärkt aufgekommen. In mehreren Studien wurde jedoch gezeigt, dass die innere Uhr nicht durch die Umstellung des Menschen auf nächtliches Arbeiten oder veränderte Rhythmusdauern beeinflusst wird. Der Verlauf von Körperkerntemperatur, verschiedenen Hormonen etc. gleicht sich also nicht an, wenn der Mensch seine aktive Phase auf die Nacht verlegt (Czeisler et al. 1999, Kelly et al. 1999, Wyatt et al. 1999). Dies liegt daran, dass der wichtigste exogene Zeitgeber, das Tageslicht, nachts nicht wirken kann. Die Wellenlängen-Zusammensetzung des elektrischen Lichts bzw. seine Lichtintensität in Räumen ist wahrscheinlich meist nicht stark genug, um als Zeitgeber zu fungieren. Das bedeutet also, dass der Mensch während einer Nachtschicht zwar wach ist, sein Körper physiologisch aber langfristig auf Schlaf eingestellt bleibt. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde Schichtarbeit und damit zusammenhängende Unterbrechungen des circadianen Rhythmus mittlerweile von der „International Agency for Resaerch on Cancer“ als wahrscheinlicher Auslöser für verschiedene Krebsarten beim Menschen klassifiziert (Pronk et al. 2010).

Neben bereits erwähnten Krankheiten konnte in mehreren Studien ein ungünstiger Einfluss von Schichtarbeit auf das Körpergewicht bzw. Adipositas belegt werden (Chen et al. 2010, Esquirol et al. 2009, Geliebter et al. 2000, Parkes 2002). Auch eine erhöhte Fehler- und Unfallrate während Nachtschichten wurde nachgewiesen (Gold et al. 1992).

Die Tatsache, dass die circadiane Rhythmik bei Patienten mit Alzheimer oder verschiedenen psychiatrischen Krankheiten wie Depressionen häufig gestört ist, ist bereits seit vielen Jahren bekannt (Bunney und Potkin 2008, van Someren 1996). Außerdem verschlechtern sich verschiedene Krankheitsbilder oft zu bestimmten Uhrzeiten (Abb. 5). Beispielsweise sinkt nachts der Blutdruck, und dies kann wiederum Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit von Herzinfarkten bei herzkranken Patienten haben (Kraft und Martin 1995, Ohdo et al. 2010).

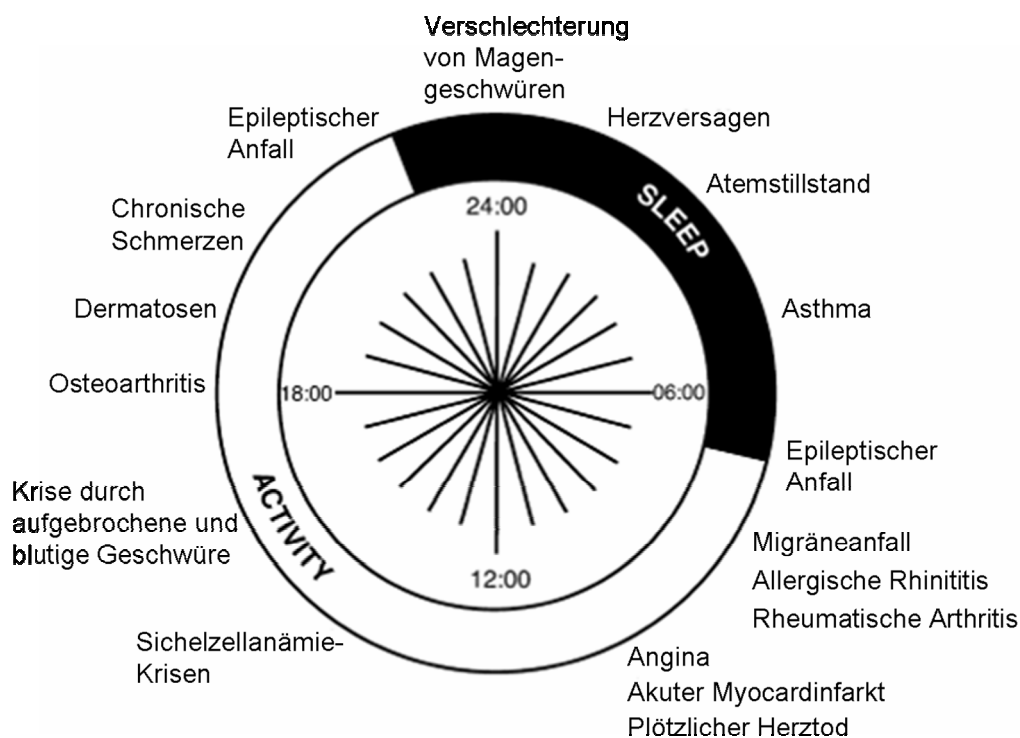


Abb. 5: 24-Stunden-Diagramm der ungefähren Zeit im Tag-Nachtrhythmus, zu der verschiedene Krankheitsbilder beim Menschen verstärkt auftreten oder sich häufig verschlechtern (Abb. verändert nach Ohdo et al. 2010)

1.3 Körperkerntemperatur des Menschen

Auch bei der Körperkerntemperatur des Menschen handelt es sich um einen endogen generierten Rhythmus. Er wird also auch dann aufrechterhalten, wenn der Mensch von äußeren Einflussfaktoren wie dem Sonnenlicht abgeschlossen ist, die ihm Hinweise auf die Uhrzeit geben. Neben einer circadianen Rhythmik der Temperatur lässt sich bei Frauen vor der Menopause auch eine circalunare Rhythmik entlang des Menstruationszykluses feststellen. Typischerweise ist die Körperkerntemperatur der Frau zu Beginn der lutealen Phase, also nach der Ovulation, etwa $0,4^{\circ}\text{C}$ höher als während der Follikelreifungsphase (Lee 1988). Bei Neonaten ist der circadiane Temperatur-Rhythmus bereits einige Tage nach der Geburt erkennbar, aber noch nicht so stark ausgeprägt, wie bei Erwachsenen. Die endgültige Etablierung des Rhythmus erfolgt innerhalb der ersten zwei Lebensjahre (Kleitman et al. 1936, Mirmiran und Kok 1991). Die Angaben, um wie viel Grad die Körperkerntemperatur eines erwachsenen Menschen innerhalb von 24 Stunden schwankt, variieren zwischen $0,7^{\circ}\text{C}$ und $1,4^{\circ}\text{C}$ (Aschoff et al 1967, Colin et al. 1968, Gander et al. 1986, Rosenthal et al. 1990). Wie in mehreren Studien gezeigt werden konnte, lässt die Fähigkeit des Menschen, seine Körperkerntemperatur zu regeln bzw. einen 24 Stunden-Zyklus aufrecht zu erhalten, mit zunehmendem Alter wieder nach. Hierbei ist bereits ab einem Alter von 40 Jahren ein deutliches Nachlassen in der Regulierungs-Effizienz nachweisbar und mit Erreichen des 60. Lebensjahres sogar eine signifikante Verringerung

feststellbar (Collins et al. 1981, Mathew et al. 1986). Außerdem wurde nachgewiesen, dass sowohl die Dauer der circadianen Körperkerntemperatur-Rhythmik als auch ihre Amplitude im Rahmen von Alterungsprozessen verringert ist (Vitiello et al. 1983, Weitzman et al. 1982). So ist die Dauer der circadianen Körperkerntemperatur-Rhythmik bei älteren Menschen im Vergleich zu jüngeren von im Mittel 25,1 Stunden auf 24,5 Stunden verkürzt.

Wenn von der Körpertemperatur des Menschen gesprochen wird, so ist meist die Körperkerntemperatur gemeint. Es soll jedoch nicht unerwähnt bleiben, dass sowohl der Verlauf der gemessenen Temperaturen als auch die absoluten Werte durchaus andere sein können, wenn man die Messungen an einer anderen Körperregion vornimmt.

Heiser und Cohen zeigten bereits 1933, dass der Verlauf der Temperaturkurve an den Extremitäten entgegengesetzt zur Temperaturkurve von Mund, Hals und Stirn ist (Aschoff 1955). Letztere haben den gleichen Verlauf wie die Kerntemperatur. Auch die absolut erreichten Temperaturen unterscheiden sich teilweise um mehrere Grad (Abb. 6).

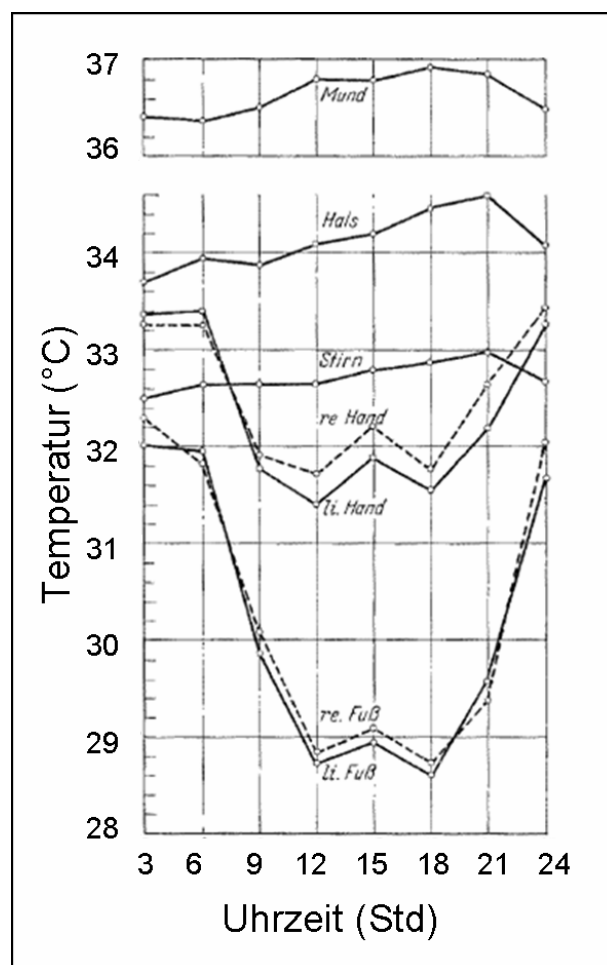


Abb. 6: Verlauf der Körpertemperatur an sieben verschiedenen Körperstellen. Der Verlauf an den Extremitäten ist ein anderer, als an Stirn, Hals und Mund (verändert nach Aschoff et al. 1967)

Wird für eine Studie die Körperkerntemperatur eines Menschen benötigt, so wird meist die Rectaltemperatur verwendet, da die wirkliche Körperkerntemperatur sehr schwer zu messen ist. Die Rectaltemperatur wird als beste Näherung angesehen (Bligh und Johnson 1973). Meist ist es jedoch ausreichend, wenn während einer Studie nicht die Körperkerntemperatur ermittelt wird, sondern die Schwankungen der Körpertemperatur an einer festgelegten Stelle ermittelt werden (Refinetti und Menaker 1991). Nach Aschoff et al. (1967) verläuft die Körperkerntemperatur bei Menschen, die morgens gegen 07:00 Uhr aufwachen und abends etwa um 23:00 Uhr zu Bett gehen, folgendermaßen: Morgens, etwa drei Stunden vor dem Erwachen, erreicht die Körperkerntemperatur einen Wert von 36,5°C. Sie steigt bis um 09:00 Uhr auf circa 37,2°C an. Der Anstieg geht langsam weiter und erreicht um 20:00 Uhr seinen Höhepunkt mit 37,4°C. Ab dann sinkt die Temperatur, bis sie morgens gegen 04:00 Uhr wieder ihr Minimum von 36,5°C erreicht.

1.4 Schlaf des Menschen

“Die Funktion des Schlafes ist eine der größten unbeantworteten Fragen der Biologie. Wir verbringen ein Drittel unseres Lebens schlafend, und wissen nicht warum“ (Benington und Heller 1995). Dieses Zitat gibt eine kurze und aussagekräftige Zusammenfassung zum Forschungsstand zur Funktion des Schlafes vor etwa 15 Jahren. Über die Funktion des Schlafes im allgemeinen und bei den Vertebraten im speziellen wurde viel spekuliert und verschiedene Hypothesen aufgestellt. Häufig wurde der Schlaf als inaktive Phase definiert. Im Laufe der Zeit zeigten sich Zusammenhänge des Schlafes mit verschiedenen physischen und psychischen Funktionen, woraus zur Zeit mindestens drei Theorien zur Funktion des Schlafes resultieren (Crocker und Sehgal 2010), die nachfolgend kurz erläutert werden sollen.

1. Die somatische Funktion. Diese Theorie besagt, dass der Körper während der Schlafphase regeneriert und für wichtige Immunfunktionen und den Metabolismus unabdingbar ist
2. Die Funktion für den zellulären Metabolismus. Die Theorie geht davon aus, dass der Körper hauptsächlich in die Schlafphase eintritt, um sich auf die Reparatur von Zellen zu konzentrieren; beispielsweise durch das Entfernen von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) oder das Auffüllen von Adenosin-Triphosphat (ATP)-Reserven.
3. Die Festigung von Gedächtnis und Erlerntem. Während der Schlafphase sind die Hippocampus-Zellen sehr aktiv, und alles, was während der Wachphase gelernt wurde, wird im Cortex konsolidiert.

Eine abschließende und absolute Antwort auf die Frage, was der Zweck des Schlafes ist, gibt es vielleicht nicht. Fest steht jedoch, dass sich die verschiedenen Theorien nicht widersprechen, sondern nebeneinander existieren können, und dass die Schlafphase extrem wichtig für Körper und Psyche ist. In einem Experiment an Ratten wurde gezeigt, dass Schlaf sogar lebenswichtig ist. Bei mehrtägigem Schlafmangel zeigten die Versuchstiere zunächst Anzeichen von Schwäche, Gleichgewichtsstörungen, ungepflegtem Fell etc. und verstarben schließlich. Eine anschließende Untersuchung zeigte, dass die Tiere innerlich unter verschiedensten Krankheitssymptomen wie Wassereinlagerungen, Ödemen und Geschwüren litten (Rechtschaffen et al 1983). Man kann davon ausgehen, dass der Schlaf für den Menschen genauso wichtig ist, wie für die Tiere, mit denen dieses Experiment durchgeführt wurde. Es ist bekannt, dass während der Ruhephase des Körpers viele verschiedene Prozesse stattfinden (s.o.). Bei allen bisher untersuchten Vertebraten konnte Schlaf nachgewiesen werden, der aber durch ontogenetische Unterschiede in den Zeitstrukturen charakterisiert ist (Fleissner 1996). Im Folgenden soll nur auf den menschlichen Schlaf eingegangen werden. Um die verschiedenen Schlafstadien objektiv unterscheiden und miteinander vergleichen zu können, werden i.a. Elektroenzephalogramme (EEG) nach Dement und Kleitmann verwendet (Fleissner 1996). Anhand der elektrischen Signale, die vom Gehirn eines Probanden abgeleitet werden und im EEG als Wellen dargestellt werden, kann man darauf zurückschließen, wann er welches Schlafstadium erreicht hat.

Grundsätzlich stellt man zunächst den Rapid-Eye-Movement (REM)-Schlaf dem Non-Rapid-Eye-Movement (NREM)-Schlaf gegenüber. Der REM-Schlaf ist charakterisiert durch schnelle Augenbewegungen hinter geschlossenenen Lidern sowie Atonie der gesamten Willkürmuskulatur. Die meisten Traumphasen finden während dieser Schlafphasen statt. Durch die weitestgehende Entspannung der Muskulatur während dieser Phasen ist gewährleistet, dass der Körper nicht sämtliche Bewegungen durchführt, die im Traum durchlebt werden. Dieser Schutzmechanismus verhindert beispielsweise Verletzungen.

Der NREM-Schlaf kann untergliedert werden in vier Schlafstadien, die sich nach ihrer Schlaftiefe unterscheiden: Vom Einschlaf- oder Leichtschlafstadium, das mit „1“ bezeichnet wird, bis hin zum Tiefschlafstadium, dem „Stadium 4“. Letzteres wird auch Delta- oder Slow-Wave-Sleep (SWS)-Stadium genannt. Sowohl die Frequenz als auch die Amplitude der abgeleiteten EEG-Linien ändern sich während der verschiedenen Schlafstadien (Abb. 7).

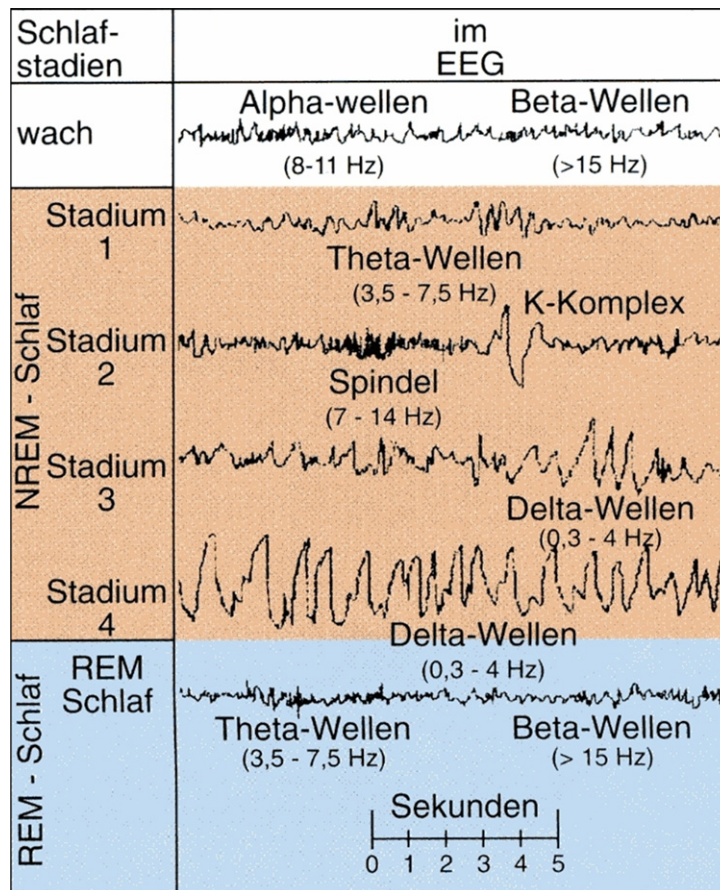


Abb. 7: Schlafstadien des Menschen. Dargestellt sind die markanten EEG-Wellen mit Angabe der für sie charakteristischen Frequenzwerte während der Wachphase (weiß), dem NREM-Schlaf (rot) und dem REM-Schlaf (blau) (verändert nach Fleissner 1996, S. 529)

Nimmt man das EEG eines Probanden über mehrere Stunden auf, während er schläft, so erhält man sein Schlafprofil. Typischerweise beginnt ein Schlafprofil mit dem Einschlafen des Probanden in „Stadium 1“ (Leichtschlaf). Die Muskeln entspannen sich, die Körperkerntemperatur liegt einige Zehntel Grad unter der Temperatur des Tages, und die Wahrnehmung der Umgebung ist vermindert. Dann werden nacheinander die tieferen Schlafstadien 2 bis 3 durchlaufen. Während dieser Phasen nimmt die Schlagfrequenz des Herzens ab und die Atmung wird ruhiger und flacher. Schließlich wird das 4. Schlafstadium (Tiefschlaf) erreicht. Dieses Stadium ist dadurch gekennzeichnet, dass das Gehirn nun vor allem erlerntes Faktenwissen abspeichert.

An diese erste NREM-Phase schließt sich die erste, meist recht kurze, REM-Phase an. Die Muskeln sind hier völlig erschlafft, das Gehirn vertieft Bewegungsabläufe. Im Anschluss an diese erreicht der Proband zunächst wieder eins der ersten beiden Schlafstadien und sinkt langsam wieder in die tieferen Stadien ab, bis er die nächste Traumphase erreicht. Im weiteren Verlauf der Nacht wird dieser zyklische Ablauf mehrfach durchlaufen (Abb. 8). Ein Zyklus kann bis zu 110 min. dauern. Im Verlauf der Nacht werden die REM-Phasen länger

und die Tiefschlafphasen kürzer. In den Morgenstunden gelangt der Schläfer über die ersten Schlafstadien wieder zurück in den wachen Zustand.

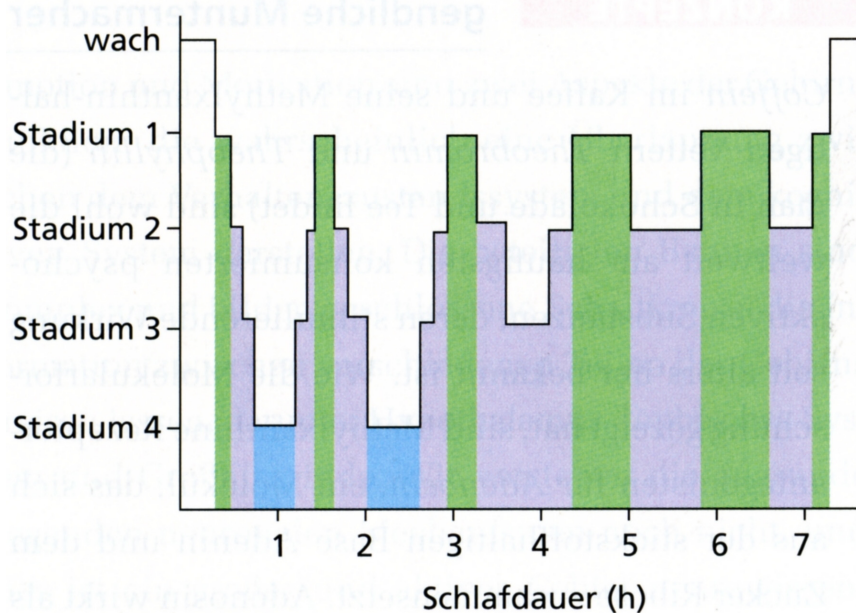


Abb. 8: Der Schlafzyklus des Menschen. Weiß: Wachphasen, grün: REM-Phasen, grau: Schlafstadien zwei und drei, blau: Tiefschlafphasen (Quelle: Silverthorn 2009, S. 457)

Das im Volksmund als „senile Bettflucht“ bekannte Phänomen bedeutet, dass die Dauer des Schlafes sich in der älteren Bevölkerung verkürzt und sich die Phasenlage vorverlagert. Diese Beobachtungen konnten in verschiedenen Studien nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass ältere Personen die tieferen Schlafstadien nicht mehr so häufig erreichen, eine verminderte Schlafeffizienz aufweisen und auch die Verteilung von REM- und NREM-Schlaf eine andere ist als bei jüngeren Probanden (Myers und Badia 1995, Weitzman et al. 1982).

1.5 Gene

Ein Gen ist definiert als Bezirk auf der DNA, der eine bestimmte Erbeigenschaft kontrolliert. Im Allgemeinen entspricht dies einem einzelnen Protein oder einer einzelnen RNA. Diese Definition umschließt die gesamte funktionelle Einheit, sowohl die codierende DNA-Sequenz als auch die nicht codierenden DNA-Sequenzen und die Introns (Alberts et al. 2004).

1.5.1 Zusammenspiel von Uhrengenen und Rückkopplungsschleifen

Die Regulierung und Aufrechterhaltung der circadianen Rhythmik erfolgt bei allen Mammalia nach dem gleichen Prinzip, das Abbildung 9 zeigt. Grundlage dieses Prinzips sind zwei autoregulatorische negative Rückkopplungsschleifen, mit deren Hilfe Genprodukte die Expression ihres eigenen Gens ab einer bestimmten Konzentration selbst herunterregulieren.

Die Erklärung dieser Mechanismen soll mit dem Teil der zentralen Rückkopplungsschleife beginnen, der im Nucleus stattfindet. Hier bildet sich zunächst ein Heterodimer aus den Proteinen CLOCK und BMAL1, das dann als Transkriptionsfaktor der Uhrengene *PER1*, *PER2*, *CRY1* und *CRY2* fungiert. Im Laufe der Zeit akkumulieren und multimerisieren die PER- und CRY-Proteine im Cytoplasma, wo sie durch die Caseinkinase I ϵ (CK I ϵ) und Glycogen-Synthase-Kinase-3 (GSK3) phosphoryliert werden. Nun translozieren die Dimere in den Nucleus, wo sie mit Heterodimeren aus den Proteinen CLOCK und BMAL1 interagieren. Durch diese Interaktion hemmen die PER/CRY-Dimere ihren eigenen aktivierenden Transkriptionsfaktor. Durch diese Hemmung wiederum sinkt die Menge der PER- bzw. CRY-Proteine wieder ab, und es sind dementsprechend auch weniger Dimere vorhanden. Hierdurch können die Proteine CLOCK und BMAL1 wieder heterodimerisieren und als Transkriptionsfaktor der Gene *PER1*, *PER2*, *CRY1* und *CRY2* fungieren. Die Expression des Gens CLOCK unterliegt keiner circadianen Rhythmik. Das Gen wird stets gleich stark exprimiert. Die Expression des Gens *BMAL1* wird innerhalb einer zweiten Rückkopplungsschleife, der stabilisierenden Schleife, kontrolliert. Diese Schleife beinhaltet den Aktivator Rora und den Inhibitor Rev-Erba. Durch die Regulation des Gens *BMAL1* werden die Oszillationen der ersten Rückkopplungsschleife verstärkt (Gallego und Virshup 2007)

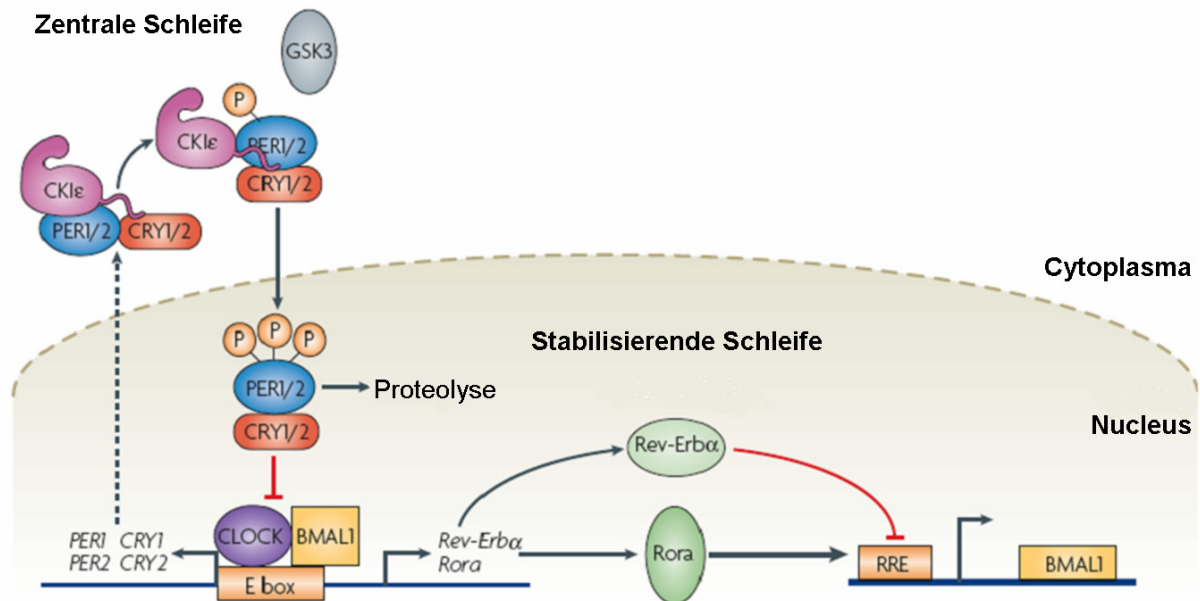


Abb. 9: Die circadiane innere Uhr wird bei Mammalia durch negative Transkriptions-Translations-Rückkopplungsschleifen kontrolliert. Die zentrale Rückkopplungsschleife beginnt mit der Heterodimerbildung von CLOCK- und BMAL1-Proteinen im Nucleus. Dieses Heterodimer fungiert als Transkriptionsfaktor der Gene *PER1* und *PER2* sowie *CRY1* und *CRY2*. Im Laufe des Tages akkumulieren und multimerisieren die PER- und CRY-Proteine im Cytoplasma, wo sie durch die Casein Kinase Iε (CK Iε) und Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3) phosphoryliert werden. Daraufhin translozieren sie in den Kern, wo sie mit den CLOCK-BMAL1-Komplexen interagieren. Durch diese Interaktion hemmen die Proteine ihren eigenen Aktivator. Am Ende eines circadianen Rhythmus degradieren die PER- und CRY-Proteine wieder, wodurch die Transkription durch *Clock* und *BMAL1* nicht weiter gehemmt wird. In einer weiteren Schleife, der stabilisierenden Schleife, wird die Expression von *BMAL1* kontrolliert. Diese Schleife beinhaltet den Aktivator *Rora* und den Inhibitor *Rev-Erbα* und verstärkt die Oszillationen. Die Expression von *CLOCK* ist über den Tag hinweg stabil. P: Phosphat, RRE: R-Response-Element (verändert nach Gallego und Virshup 2007)

1.5.2 Uhrengene (Zielgene)

Es wird angenommen, dass etwa 10% aller menschlichen Gene in circadianem Rhythmus oszillieren (Panda et al. 2002a). Zwei wichtige menschliche Uhrengene sind *hBMAL1* und *hPER1*, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Deshalb sollen sie ausführlicher erläutert werden.

1.5.2.1 Humanes Brain and Muscle ARNT-like (*hBMAL1*)-Gen

Das Gen „Brain and muscle ARNT-like“ (*BMAL1*) wird in der Literatur unter mehreren Namen (*TIC*; *JAP3*; *MOP3*; *BMAL1*; *PASD3*; *BMAL1c*; *bHLHe5*; *MGC47515*; *ARNTL*) geführt. Hierbei ist „Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like“ (*ARNTL*) der offizielle Name. Da in der überwiegenden Zahl der Forschungsarbeiten jedoch der Name „*BMAL1*“ verwendet wird, soll dies auch in der vorliegenden Arbeit so gehandhabt werden. Das Gen ist beim Menschen auf dem Chromosom 11 an der Stelle 11p15 lokalisiert. Bei dem Protein, das durch das Gen codiert wird, handelt es sich um ein „basic helix-loop-helix“-

Protein, das innerhalb einer negativen Rückkopplungsschleife ein Heterodimer mit dem Protein CLOCK bildet. Der Komplex aus beiden Proteinen bindet an ein E-Box-Element, das upstream des *hPER1*-Gens liegt und die Transkription dieses Gens aktiviert. Bisher sind drei Transkript-Varianten, die für zwei Isoforme codieren, bekannt. Die Transkription des *hBMAL1*-Gens unterliegt einem circadianen Rhythmus. Die Genexpression verläuft tagsüber auf einem relativ niedrigen Level und steigt in den Abendstunden an. Das Expressions-Minimum findet sich etwa gegen acht Uhr morgens, das Expressions-Maximum wird gegen 20 Uhr (Abb 10) erreicht (Bunney 2000, Dunlap 1999).

1.5.2.2 Humanes Period homolog 1 (*hPER1*)-Gen

Das Gen *Period1* wurde ursprünglich in einer Mutante der Fliege *Drosophila melanogaster* entdeckt (Konopka und Benzer 1971). Das humane Homolog ist auf dem Chromosom 17 an der Stelle 17p13.1-p12 lokalisiert. Es ist eines aus einer Familie von drei Genen (*PER1*, *PER2*, *PER3*), und wird in einem circadianen Expressionsmuster im SCN exprimiert. Hierbei findet sich das Expressions-Minimum etwa gegen 20 Uhr, und das Expressions-Maximum zwischen 06:30 und 09:30 Uhr. Die Expression verläuft somit entgegengesetzt zu der Expression des oben beschriebenen *hBMAL1*-Gens (Abb. 10).

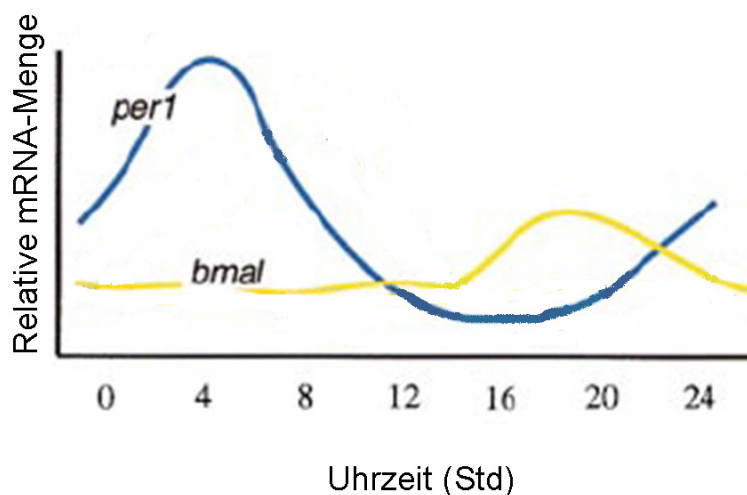


Abb. 10: Circadianer Expressions-Verlauf der Gene *BMAL1* und *PER1* bei Mammalia (verändert nach Dunlap 1999)

1.5.3 Haushaltsgene

Ein Haushaltsgen ist definiert als „Gen für eine Funktion aller Zelltypen eines Organismus, unabhängig von deren spezieller Aufgabe“ (Alberts et al. 2004). Dies bedeutet, dass das Expressionslevel von Haushaltsgenen in einem Gewebe theoretisch immer gleich hoch ist. Damit eignet sich ein Haushaltsgen als Referenz für die relative Quantifizierung von Zielgenen. Es konnte aber bereits mehrfach nachgewiesen werden, dass auch

Haushaltsgene, für die ein festes Expressionslevel angenommen wurde, unter bestimmten Bedingungen vom Organismus reguliert werden (Schmittgen 2000, Vandesompele 2002, Zhong und Simons 1999). Die Auswahl eines Haushaltsgens sollte deshalb sorgfältig erfolgen bzw. es muss vor der Verwendung eines Haushaltsgens als Standard überprüft werden, ob das Haushaltsgen unter den Studienbedingungen reguliert wird. Wenn es nicht reguliert wird, kann durch Quotientenbildung von Expressionslevel des Zielgens und Expressionslevel des Haushaltsgens auf den Expressionsgrad des Zielgens zurückgeschlossen werden. Für die Durchführung der relativen Quantifizierung (Kap. 3.3.5.10) innerhalb dieser Studie standen die nachfolgenden drei Haushaltsgene zur Auswahl.

1.5.3.1 *Humanes Acidic Ribosomal Phosphoprotein P0 (hRPLP0, h36B4)-Gen*

Das Gen „*Acidic Ribosomal Phosphoprotein P0*“ wird in der Literatur auch unter dem Namen „*36B4*“ geführt. Es wurde in der Literatur bereits mehrfach als Haushaltsgen in Studien mit menschlichen Probanden aufgeführt (Teboul et al. 2005, Quan et al. 2002). Das Gen codiert für ein ribosomales Protein der 60S Untereinheit von Ribosomen. Es ist lokalisiert auf dem Chromosom 12 an der Stelle 12q24.2. Es existieren mehrere alternative Spleiß-Varianten, die für dasselbe Protein codieren (URL [3]).

1.5.3.2 *Humanes Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (hGAPDH)-Gen*

Dieses Gen liegt beim Menschen auf dem Chromosom 12, am Gen-Locus 12p13 (URL [3]). Es stellt eines der klassischen Haushaltsgene dar und wurde bereits in vielen Studien angewendet. Bei dem Protein handelt es sich um ein Schlüsselenzym der Glykolyse. Das Enzym katalysiert die oxidative Phosphorylierung von Glyceraldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Diphosphoglycerat. Das Enzym stellt strukturell ein Tetramer aus identischen Ketten dar (Sirover 1999).

1.5.3.3 *Humanes Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyl Transferase (hHPRT)-Gen*

Das humane Gen *Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyl Transferase (hHPRT)* besteht aus 47524 bp, weist neun Exons auf und liegt beim Menschen auf dem X-Chromosom an der Stelle q26.1 (URL [3]).

Das Enzym, das durch dieses Gen codiert wird, ist eine Transferase, die die Umwandlung von Hypoxanthin zu Inosin-Monophosphat und Guanin zu Guanosin-Monophosphat katalysiert. Bekannte Krankheiten, die mit einer Mutation in dem Gen zusammenhängen, sind das Lesch-Nyhan-Syndrom (Hyperurikämie) und Gicht.

1.6 Hormone

Zwei wichtige Hormone des Menschen, die mit einer circadianen Rhythmik in Zusammenhang stehen bzw. einer circadianen Rhythmik unterworfen sind, sind Cortisol und Melatonin.

1.6.1 Cortisol

Bei dem Hormon Cortisol handelt es sich um ein Glucocorticoid, welches circadian in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde (Abb.11) produziert wird.

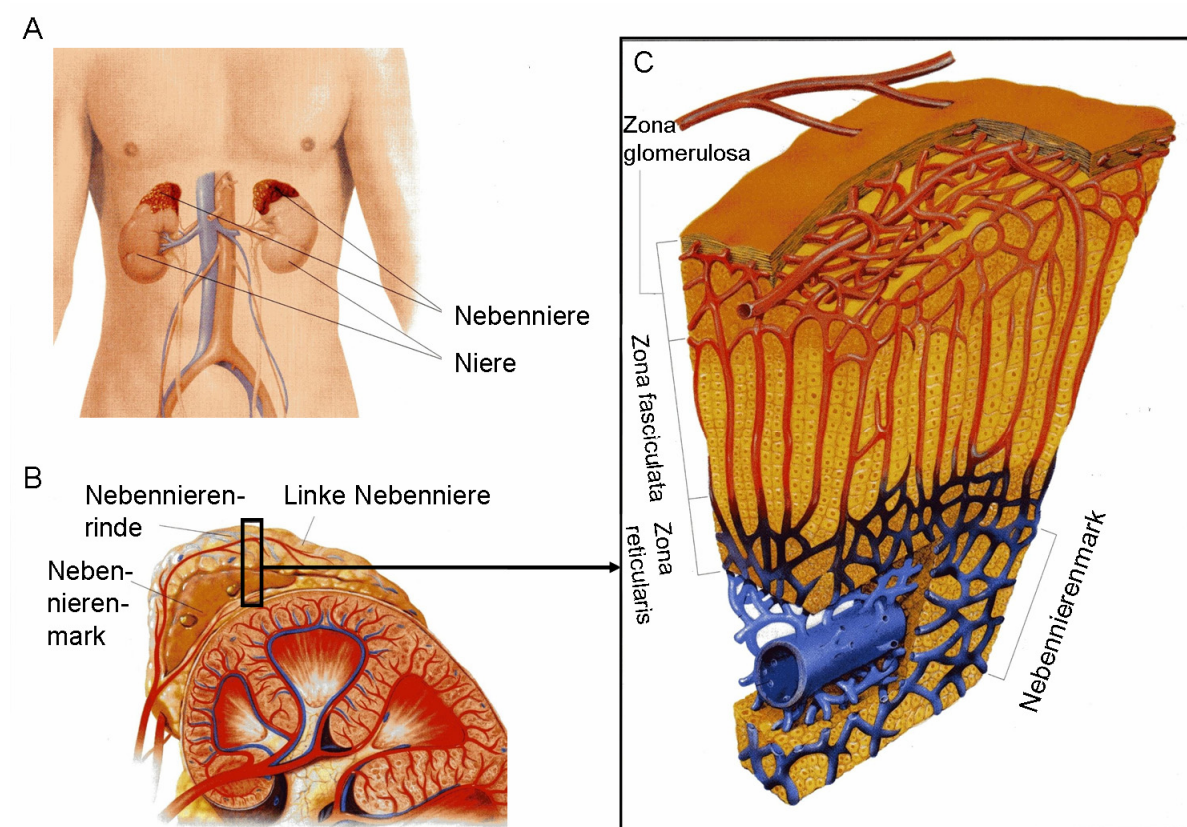


Abb. 11: Nebennierenrinde des Menschen. A: Lage von Niere und Nebenniere im menschlichen Körper. B: Längsschnitt durch die Nebenniere und einen Teil der Niere. C: Vergrößerter Teilausschnitt der Nebennierenrinde mit Benennung der verschiedenen Schichten (verändert nach: Anatomica 2004, S. 364, 365)

Nur 10% des im Blutplasma vorkommenden Cortisols liegen frei vor. Dagegen sind 75% des Cortisols an corticosteroidbindendes Globulin gebunden, und 15% an Albumin (Roche Lexikon Medizin 2003). Grundlage des Synthesewegs ist das Cholesterin. Dieses wird während mehrerer Schritte in der Nebennierenrinde über Pregnenolon und Progesteron zu 17α -Hydroxydesoxycorticosteron und schließlich zum Cortisol umgewandelt (Roche Lexikon Medizin 2003). Die Regulation der Cortisol-Synthese erfolgt entlang der

Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (Hypothalamic Pituitary Adrenal Axis, HPA-Axis) (Abb. 12). In einem negativen Rückkopplungsschleifen-Mechanismus wird die Cortisol-Sekretion in der Nebennierenrinde über die Konzentration des freien Cortisols im Blut reguliert. Hierbei spielt das Hormon CRH (Corticotropin releasing hormone) eine entscheidende Rolle. Es wird im Hypothalamus gebildet und regt dadurch die Ausschüttung des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) aus dem Hypophysenvorderlappen an. Das ACTH fördert seinerseits die Cortisol-Sekretion in der Nebennierenrinde. Das Cortisol wirkt als negatives Rückkopplungssignal und hemmt die Ausschüttung von CRH und ACTH.

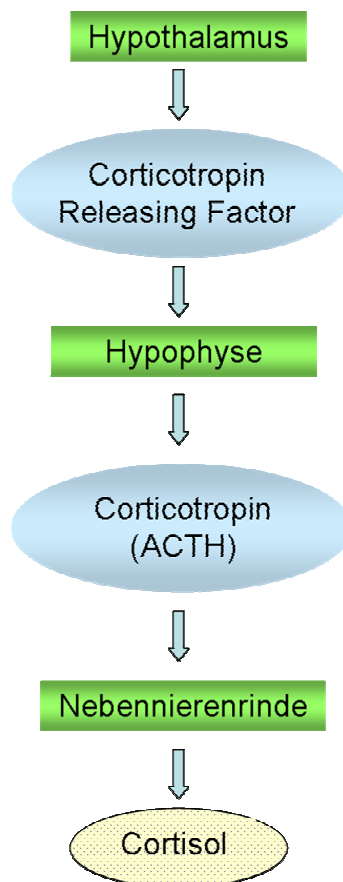


Abb. 12: Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (HPA)-Achse. Das Hormon CRH wird im Hypothalamus gebildet und regt die Ausschüttung des des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) aus dem Hypophysenvorderlappen an. Das ACTH fördert die Cortisol-Sekretion in aus der Nebennierenrinde

Die Cortisol-Produktion findet hauptsächlich während der zweiten Nachthälfte, also während des Schlafes, statt. Der Anstieg beginnt vom Konzentrations-Minimum ausgehend, das etwa gegen 24:00 Uhr erreicht wird. So steht dem Körper am Morgen ein Depot zur Verfügung,

das er über den Tag hinweg aufbrauchen kann. Die höchste Konzentration dieses Hormons wird morgens kurz nach dem Erwachen erreicht.

Das Phänomen, welches beschreibt, dass die Cortisol-Konzentration morgens während der ersten 30min. nach dem Erwachen um 50% bis 100% ansteigt, wird Cortisol-Aufwachreaktion (CAR) genannt (Griefahn und Robens 2010, Clow et al. 2009, Dockray et al. 2008). Die Cortisol-Aufwachreaktion wird durch Verhältnissbildung der Cortisol-Aufwach-Konzentration und der Konzentration 30 Minuten später errechnet. Der CAR-Wert ist somit einheitslos.

Cortisol hat mehrere Funktionen im menschlichen Körper. So beeinflusst es den Kohlenhydrathaushalt, den Fettstoffwechsel, den Proteinumsatz und die Regulation des Wasser- und Salzhaushaltes. Zudem hat das Hormon eine entzündungshemmende Wirkung. Die größte Bedeutung hat das Cortisol als das wahrscheinlich wichtigste Stresshormon im menschlichen Körper. Es wird sowohl bei dauerhaftem psychischem als auch bei physischem Stress vermehrt ausgeschüttet. Als Reaktion des Körpers erhöht sich die Körperkerntemperatur, der Energiestoffwechsel wird aktiviert, Schmerzreaktionen werden gehemmt, und die Wundheilung wird angeregt. Insgesamt werden Stress-Situationen so als weniger belastend empfunden. Auch bei intensiver sportlicher Betätigung, die eine Art von physischem Stress darstellt, steigt der Cortisolspiegel stark an. Bei dauerhaftem Stress, und somit auch dauerhafter vermehrter Cortisol-Ausschüttung, kann das Immunsystem geschwächt werden, und es besteht eine erhöhte Gefahr für Depressionen. Weiterhin kann sich ein chronischer Cortisolüberschuss zu Übergewicht, Diabetes, Osteoporose und Hautveränderungen führen. Außer bei erhöhtem Stress kann ein erhöhter Cortisol-Spiegel bei Frauen während der Schwangerschaft, unter Einnahme oraler Kontrazeptiva oder bei einer Östrogen-Therapie beobachtet werden. Morbus Cushing ist eine Krankheit, bei der es infolge einer Hypothalamusfunktionsstörung zu einer Überproduktion von Nebennierenrindenhormonen kommt (Roche Lexikon Medizin 2003). Die Symptome dieser Krankheit können sich beispielsweise in Stammfettsucht, Nackenverdickung, Steroidakne, roter Gesichtsfarbe, Vollmondgesicht, Elektrolytstörungen, Müdigkeit, Wachstumsstörungen bei Kindern und allgemeiner Leistungsschwäche äußern. Abbildung 13 zeigt einen Mann, der aufgrund eines Hypophysenadenoms an Morbus Cushing litt. Er weist das für Morbus Cushing typische Vollmondgesicht auf. Das Adenom wurde operativ entfernt, und nach einem Jahr hatte sich das Vollmondgesicht weitgehend zurückgebildet (URL [4]).



Abb. 13: Patient mit Morbus Cushing. A: Gesicht eines Mannes mit Hypophysenadenom, das zu einer vermehrten Ausschüttung von Cortisol und infolgedessen zu einem Vollmondgesicht führte. B: Derselbe Mann ein Jahr nach der operativen Entfernung des Adenoms. Das Vollmondgesicht hat sich zurückgebildet (Quelle: URL [4])

Im Gegensatz dazu kann chronischer Cortisolmangel bei Morbus Addison, einer Autoimmunkrankheit, auftreten. In diesem Falle zeigen die Patienten Symptome wie Übelkeit, Appetitlosigkeit, Salzhunger, niedrigen Blutdruck, Entzündungen, Abnahme der körperlichen Leistungsfähigkeit, Mattigkeit und Antriebsschwäche. Ein chronischer Cortisolmangel findet sich auch bei Patienten mit dem Burn-out-Syndrom.

Die Frage, ob sich die Cortisol-Syntheserate im menschlichen Körper im Rahmen von Alterungsprozessen ändert, ist umstritten (Wrosch et al. 2009, van Cauter et al. 2000)

1.6.2 Melatonin

Bei dem Hormon Melatonin handelt es sich um ein Molekül, das evolutiv bereits sehr alt ist, und Einfluss auf viele verschiedene physiologische Vorgänge im Körper von Vertebraten hat (Cassone und Natesan 1997). Die Synthese des Hormons geht von der Aminosäure Tryptophan aus und führt über Serotonin zu Melatonin (Abb. 14).

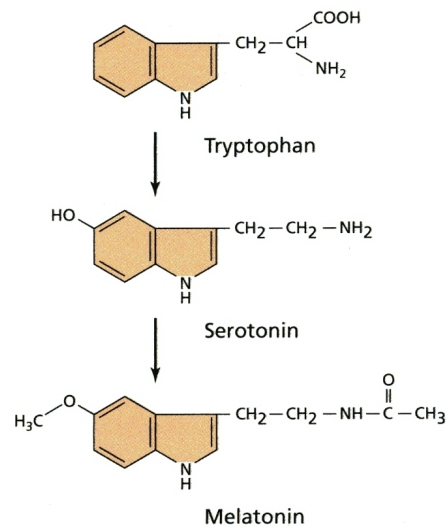


Abb. 14: Schema der Melatoninsynthese. Ausgehend von der Aminosäure Tryptophan wird Melatonin über den Zwischenschritt des Serotonins synthetisiert (Quelle: Moyes und Schulte 2009, S. 146)

Die Synthese findet bei Vertebraten, also auch beim Menschen, in der Epiphyse statt. Die Abbildung 15) zeigt schematisch die Lage der Epiphyse im menschlichen Gehirn.

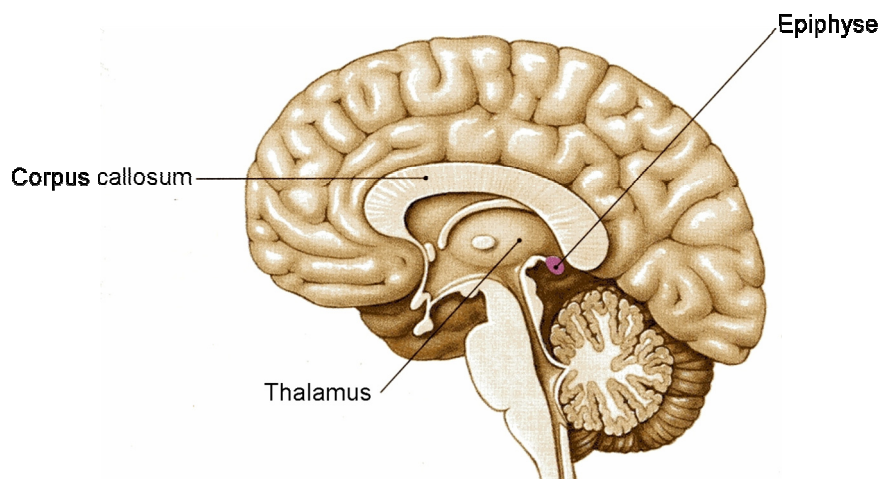


Abb. 15: Längsschnitt durch das menschliche Gehirn mit eingezeichneter Lage von Epiphyse, Thalamus und Corpus callosum (verändert nach Silverthorn 2009, S.351)

Die Melatonin-Synthese unterliegt einer circadianen Rhythmik, wobei sie hauptsächlich während der späten Abend- und Nachtstunden vonstatten geht. Dies gilt sowohl für tagaktive Tiere, als auch für nachtaktive Tiere (Revel et al. 2007). Dementsprechend ist die Melatonin-Konzentration im Körper nachts am höchsten und sinkt in den Morgenstunden wieder ab. Die

Abbildung 16 zeigt schematisch den Verlauf der Melatonin-Konzentration im menschlichen Körper.

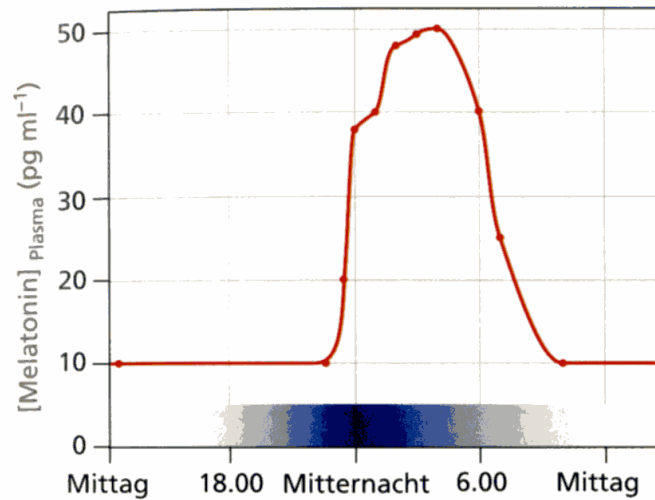


Abb. 16: Tag-Nachtverlauf der Melatonin-Konzentration im menschlichen Körper (Quelle: Silverthorn 2009, S. 351)

Das Hormon wird oft als internes Dunkelsignal bezeichnet (Fleissner 1996), und tritt immer wieder im Zusammenhang mit verschiedenen lange dauernden Rhythmen auf. Unter anderem ist der Einfluss von Melatonin auf das Schlafverhalten sowie den Tagesrhythmus der Stoffwechselintensität und jahreszeitliche Aktivitätsschwankungen bekannt (Chemineau et al 2008, Paredes et al. 2009, Volkov et al. 2007). Bei einer Reihe von Fischen, Amphibien und Vögeln stellt die Epiphyse eine Kombination von Sinnesorgan und inkretorischer Drüse dar (Hanke 1996). Bei diesen Tieren kann das Schädeldach teilweise von Licht durchstrahlt werden und das Licht auf die Epiphyse treffen. Diese reguliert dann über das eingehende Signal die Melatonin-Synthese (Hanke 1996). So reagieren beispielsweise in Kultur dispergierte Zellen der Hühner-Epiphyse auf Licht (Takahashi et al. 1980).

Bei den Säugern hat die Epiphyse keine photosensorische Funktion mehr. Hier ist es eine dunkelaktive Melatonin-drüse (Fleissner 1996). Die Lichtintensität wird bei Säugern über Zellen der Retina registriert, und über den Retino-Hypothalamischen-Trakt (RHT) zunächst zu den Suprachiasmatischen Nuclei, und über das obere Cervicalganglion zu der Epiphyse geleitet (Fleissner 1996). Hierbei beeinflusst hauptsächlich der blaue Anteil des Lichts die Synthese-Regulation des Melatonins (Lockley et al. 2003). Wenn es dämmerig wird, wird dies registriert und als Nervensignal zunächst zu den SCN weitergeleitet. Die Hemmung der Melatonin-Synthese in der Epiphyse fällt dadurch weg, das Hormon wird vermehrt synthetisiert und in den Blutkreislauf abgegeben. So wird das Nervensignal in ein hormonelles umgewandelt.

Neben den SCN finden sich im menschlichen Körper Melatonin-Rezeptoren in den thermoregulatorischen Zentren des Hirnstammes, in Blutgefäßen des Gehirns und in Immunzellen (Roche, Lexikon Medizin 2003).

Dim Light Melatonin Onset

Ein wichtiger Begriff im Zusammenhang mit dem Melatonin ist der Dim Light Melatonin Onset. Hierbei handelt es sich um eine Schwellenwert-Konzentration des Melatonins im Körper. Das Überschreiten dieser Konzentration markiert den Beginn der abendlichen Melatonin-Synthese. Er wird als der zuverlässigste Indikator für die circadiane Phasenlage eines Menschen angesehen (Burgess, 2008). Wie Leibenluft et al. 1996 sowie Voultzios et al. 1997 feststellten, ist neben dem Blutplasma auch der Speichel geeignet, um die Melatonin-Konzentration im menschlichen Körper zu ermitteln, und damit auch den DLMO errechnen zu können. In der Literatur finden sich verschiedene Definitionen und Berechnungsmöglichkeiten, um den DLMO festzustellen. Neben der Möglichkeit, einen festen Wert als Schwellenwert zu definieren, der dann für alle Probanden gleich ist (Pandi-Perumal 2007, Nagtegaal et al 1998), kann man den DLMO für jeden Probanden individuell ausrechnen (Voultzios et al. 1997, Burgess 2001). Bei den meisten Menschen tritt der DLMO im Zeitraum zwischen 19:30 Uhr und 22:00 Uhr auf (Pandi-Perumal 2007).

1.7 Zusammenspiel von Suprachiasmatischen Nuclei, Uhrengenen, Melatonin, Cortisol und Körperkerntemperatur

Der wichtigste exogene Zeitgeber für den Körper ist der natürliche Wechsel zwischen Hell- und Dunkelphasen der Umwelt. Über retinale Ganglienzellen in der Netzhaut wird die Lichtintensität registriert. Die Information wird über Nervenbahnen zum SCN, der übergeordneten Hauptuhr des Körpers, weitergeleitet. Wenn die Lichtintensität gegen Abend abnimmt, senden die SCN Signale aus, die dazu führen, dass die Hemmung der Melatoninsynthese in der Epiphyse vermindert wird, und dadurch verstärkt Melatonin produziert wird. Das Melatonin wird über das Blutgefäßsystem im Körper verteilt und gibt das Signal an den Körper, sich müde zu fühlen. Gleichzeitig führt es dazu, dass die Körperkerntemperatur sinkt (Burgess 2001). Aufgrund des Befehls „Schlaf“, der durch das Hormon Melatonin an den Körper übermittelt wird, werden Herzschlag und Atmung ruhiger, die willkürlich bewegbaren Muskeln erschlaffen (Silverthorn 2009) und die Produktion des Hormons Cortisol in den Nebennierenrinden wird herunterreguliert. Der Mensch schläft ein und durchläuft in der Nacht mehrfach REM- und NREM-Phasen.

Im Zeitraum von Mitternacht bis ca. vier Uhr morgens erreicht der Melatoninspiegel sein Maximum, und der Cortisolspiegel sein Minimum. Die Körperkerntemperatur erreicht gegen

Einleitung

etwa vier Uhr morgens ebenfalls ihr Minimum. Ab diesem Zeitpunkt sinkt der Melatoninspiegel wieder langsam und der Cortisolspiegel im Blut steigt an. Die Tiefschlafphasen werden weniger oft erreicht, und der Mensch kommt während des Erwachens langsam wieder zu Bewusstsein zurück. Ab jetzt kann er seine Muskulatur auch wieder willkürlich bewegen und nimmt äußere Reize wie Bettwärme und Licht bewusst wahr. Etwa 30 Minuten nach dem Erwachen wird das Maximum der Cortisol-Konzentration erreicht.

2 Fragestellungen

Bisher liegen kaum Untersuchungen zum Thema circadiane Rhythmik und Altern beim Menschen vor. Dies gilt insbesondere für die Veränderung der Expression von Uhrengenen bei älteren Menschen (Ando et al. 2010, Hida et al. 2009). Auch wurde nach Kenntnis der Autorin bisher bei älteren Menschen noch nicht der Zusammenhang zwischen Schlafverhalten und der Aktivität von Uhrengenen oder der Zusammenhang zwischen Schlafverhalten und Veränderungen in der Konzentration der Hormone Melatonin und Cortisol untersucht. Deshalb sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals der Zusammenhang zwischen ausgewählten circadian exprimierten Uhrengenen, circadianen Konzentrationsveränderungen der Hormone Cortisol und Melatonin, dem Verlauf der Körperkerntemperatur und der Schlafqualität von älteren Probanden im Vergleich zu jüngeren Probanden untersucht werden.

Folgende Fragestellungen standen hierbei im Vordergrund:

1. Unterscheiden sich ältere und jüngere Menschen in der Rhythmik der circadianen Markersysteme Körperkerntemperatur, Hormonsynthese und Uhrengen-Expression?
2. Gibt es darüber hinaus Geschlechtsunterschiede zwischen älteren Menschen in Bezug auf diese Markersysteme, und haben sie Einfluss auf die Schlafqualität der älteren Menschen?
3. Im Laufe des Erwachsenen-Lebens verschiebt sich der Chronotyp des Menschen immer weiter in Richtung Morgentyp. Manifestiert sich diese Verschiebung in einer veränderten Expression von Uhrengenen?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene circadiane Markersysteme (Uhrengene, Hormone, Körperkerntemperatur) untersucht. Diese sollten in verschiedenen Probandengruppen betrachtet werden und nach Zusammenhängen mit Alternsprozessen, Schlafqualität und Geschlechtsunterschieden gesucht werden.

3 Probanden, Material und Methoden

3.1 Probanden

Das Studienprotokoll der vorliegenden Studie wurde der Ethikkommission an der medizinischen Fakultät der Christian Albrechts Universität (CAU) zu Kiel am 06.02.2008 zur Begutachtung vorgelegt. Die Studie erhielt am 10.02.2008 ein positives Votum und ist unter dem Aktenzeichen A110/08 registriert. Alle Probanden erhielten vor Studienbeginn eine schriftliche Probandeninformation (A1), und unterzeichneten eine Einverständniserklärung (A2).

Entsprechend der Fragestellungen wurden vor Studienbeginn folgende Probandengruppen festgelegt:

1. Ältere Probanden beiderlei Geschlechts im Alter ab 60 Jahren
2. Jüngere weibliche Probanden. Alle Studienteilnehmerinnen in dieser Gruppe mussten zwischen 18 und 30 Jahren alt sein und eine gute Schlafqualität aufweisen.

Diese Kriterien begründeten sich folgendermaßen: Alle Studienteilnehmer mussten volljährig sein, um ihr Einverständnis für die Teilnahme an dieser Studie geben zu können. Weiterhin mussten die jüngeren Probandinnen eine gute Schlafqualität aufweisen, da sie als junge Kontrollgruppe im Vergleich zu den älteren guten und schlechten Schläfern dienen sollten. Die Schlafqualität wurde mit Hilfe eines Fragebogens (Kap. 3.3.1.4) ermittelt.

Innerhalb der älteren Probandengruppen war sowohl eine gute wie auch eine schlechte Schlafqualität möglich, da auch ein Vergleich zwischen diesen beiden Untergruppen vorgesehen war. Zu einem Ausschluss von Probanden aus der Studie führten die Einnahme von Betablockern, Schlaftabletten, Melatoninpräparaten oder Anti-Depressiva, sowie Zahnfleischbluten. Hierfür gab es mehrere Gründe. So konnte gezeigt werden, dass die Melatoninkonzentration von Menschen beeinflusst sein kann, die Betablocker oder Anti-Depressiva einnehmen (Cowen et al. 1985, Gooneratne et al. 2003, Skene et al. 1994). Hierbei stehen Antidepressiva mit erhöhten Melatonin-Konzentrationen und verlängerten Synthese-Zeiten in Zusammenhang (Skene et al. 1994), und Betablocker mit niedrigeren Melatonin-Konzentrationen (Cowen et al. 1985). Weiterhin ist die Melatoninkonzentration im Blut grundsätzlich höher als im Speichel. Zahnfleischbluten, also Blut im Speichel, hätte dementsprechend zu erhöhten Melatonin-Messwerten geführt. Am gesamten Untersuchungstag in den Räumlichkeiten der Abteilung für Humanbiologie des Zoologischen Instituts der CAU Kiel war es den Probanden weiterhin untersagt, bestimmte melatoninhaltige Lebensmittel (Bananen, Schokolade, Walnüsse) sowie Koffein oder Teein zu sich zu nehmen. Hierdurch sollte eine nahrungsbedingte Beeinflussung des Melatoninspiegels vermieden werden.

Die Rekrutierung der Studienteilnehmer erfolgte im Rahmen einer Ringvorlesung für ältere Menschen („Alter, Gesundheit und aktiver Lebensstil“, veranstaltet von Prof. Dr. phil. Jan Peters Janssen) an der CAU Kiel, über einen Zeitungsartikel („Richtig ticken“) in der „Unizeit“ vom 31.05.2008 sowie über Mundpropaganda.

Insgesamt wurden 34 ältere Probanden (14 Männer, 20 Frauen) im Alter von 60 bis 82 Jahren sowie zehn jüngere Frauen im Alter von 23 bis 28 Jahren in die Untersuchung einbezogen.

Allen Probanden wurden die von ihnen persönlich erhobenen Ergebnisse nach Abschluss der Auswertung schriftlich zugesandt. Es wurde keine finanzielle Gegenleistung für die Teilnahme an der Studie erbacht. Der Zeitraum der Datenerhebung erstreckte sich vom 9. Mai 2008 bis zum 24. September 2008. Da die „Sonnengleiche“ am 23. September ist, wurden somit die Sommermonate abgedeckt.

3.2 Material

Zur Durchführung von molekularbiologischen Untersuchungen sowie der anschließenden computergestützten Datenauswertung wurden die nachfolgend aufgeführten Materialien verwendet.

Bezeichnung	Hersteller
Chemikalien	
2-Propanol (Isopropanol) Rotipuran $\geq 99,8\%$	Roth, Karlsruhe
Agarose (Elektrophoresis Grade)	Invitrogen, Darmstadt
Agarose Broad Range	Roth, Karlsruhe
Chloroform minimum 99%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol Rotipuran $\geq 99,8\%$	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromidlösung 1% (10mg/ml)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid $\geq 99\%$	Roth, Karlsruhe
TRI [®] Reagent BD	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasser	
LiChrosolv [®] Wasser für die Chromatographie	Merck, Darmstadt
Wasser für die Molekularbiologie DEPC-behandelt	Roth, Karlsruhe
Wasser doppelt destilliert	Roth, Karlsruhe
Enzyme, Standards und dNTPs	
6 × Orange loading dye solution	Fermentas, St. Leon-Rot
Deoxyribonuclease I (DNaseI), RNase-free	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
dNTP-Mix (Deoxynucleoside Triphosphate Set)	Roche Diagnostics, Mannheim
FastStart Taq DNA	Roche, Mannheim

Gene Ruler™ DNA Ladder, Low Range	Fermentas, St. Leon-Rot
Hot Start Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden
HotStart Taq Plus	Roche, Mannheim
O´GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus, ready-to-use	Fermentas, St. Leon-Rot
Ribo Ruler™ RNA Ladder, High Range	Fermentas, St. Leon-Rot
RiboLock™ RNase Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Rot
RNASE AWAY®	Molecular Bio Products, San Diego, Californien, USA
RNase AWAY™	Roth, Karlsruhe
RiboRuler™ RNA Ladder, High Range	Fermentas, St. Leon-Rot
Taq DNA Polymerase	Roche, Mannheim
TrackIt™ λHind III Fragments	Invitrogen, Darmstadt
Puffer	
10 × PCR-Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim
Rotiphorese® 10 × TBE Puffer	Roth, Karlsruhe
Tris-Borate-EDTA buffer, 10x Concentrate	Sigma, Steinheim
UltraPure® 10 × TBE Buffer	Invitrogen, Darmstadt
Oligonukleotide und Sonden	
Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Eurofins synthetisiert und HPLC-gereinigt geliefert. Eine Liste findet sich im Anhang A14	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Universal ProbeLibrary Probe (Nr. 06, 18, 25, 31, 34, 60, 62, 73, 78)	Roche, Mannheim
Kits	
Absolutely RNA® Miniprep Kit	Stratagene, La Jolla, CA USA
Cortisol ELISA	IBL International, Hamburg
Crystal RNA Mini Kit	Biolab Products, Göttingen
High Pure RNA Isolation Kit	Roche, Mannheim
LightCycler® TaqMan® Master	Roche, Mannheim
Non-Extraction Melatonin Saliva ELISA	IBL International, Hamburg
NucleoSpin® RNA L	Macherey Nagel, Düren
PureYield™ RNA Midiprep System	Promega, Mannheim
QuantiTect® Reverse Transcription	Qiagen, Hilden
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis	Fermentas, St. Leon-Rot

Kit

RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy® Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Darmstadt
Total RNA Isolation	Macherey Nagel, Düren
Transcriptor First strand cDNA Synthesis Kit	Roche, Mannheim
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Sample Kit	Roche, Mannheim

Cycler:

LightCycler® 1.0	Roche, Mannheim
Personal Cycler	Biometra, Göttingen
TGradient	Biometra, Göttingen

Zentrifugen:

Mikro 120	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Rotina 38R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Gelkammern und Powersupply:

Consort EV231	Consort, Turnhout, Belgien
Horizon® 58R	Whatman Biometra, Göttingen
Horizon®11·14	Whatman Biometra, Göttingen

Gel-Dokumentationsanlage:

Gel Jet Imager 2005	INTAS, Göttingen
---------------------	------------------

Reagenzglasschüttler :

IKA MS3 digital	IKA, Staufen
IKA VF2	IKA, Staufen
IKA®-Lab-Dancer	IKA, Staufen

Photometer und Küvetten:

Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
NanoDrop	Peqlab, Erlangen
UVette (50-2000 µl)	Eppendorf, Hamburg

Gefrierschränke:

Ultra Low Temperature Freezer U410	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Premium NO FROST	Liebherr, Ochsenhausen

Pipetten:

Eppendorf Multipette® stream	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Research® (2,5 µl; 10 µl; 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg

Eppendorf Research® pro 8-Kanal

Eppendorf, Hamburg

Spitzen und Reaktionsgefäße::

0,2 ml Thermo-Tube

ABgene, Epsom, Surrey, GB

Biosphere® –Qualitätsspitzen (2,5 µl; 10 µl; 100 µl, 1000 µl)

Sarstedt, Nürmbrecht

Ep T.I.P.S 300 µl

Eppendorf, Hamburg

Eppendorf Combitips® plus 5 ml

Eppendorf, Hamburg

LightCycler® Capillaries (20 µl)

Roche, Mannheim

Multi® -Reaktionsgefäße 1,7 ml

Roth, Karlsruhe

Multi® -Reaktionsgefäße 2 ml

Roth, Karlsruhe

Zentrifugenröhrchen 50 ml

Sarstedt, Nürmbrecht

Kanülen und Spritzen:

Injekt® 5ml Luer

Roth, Karlsruhe

Sterican® Kanülen

Braun, Melsungen

Mikrowelle und Heizblöcke:

HLC Heizblock Thermostat HBT 130-2

Heap Labor Consult, Bovenden

Mikrowelle WP-100 P17

Hanseatic, Löhne

Handschuhe:

Rotiprotect® -Latex (puderfreie Handschuhe)

Roth, Karlsruhe

Rotiprotect® -Nitril Einmalhandschune

Roth, Karlsruhe

Sonstiges:

CertoClav Tisch-Autoclav

CertoClav, Traun/Austria

Flockeneisbereiter AF 120

Scotsman, Ipswich, Suffolk, GB

Labortimer SKT338N

Roth, Karlsruhe

LightCycler® Capping Tool

Roche, Mannheim

Lichtmessgerät PCE-172

PCE-Group, Meschede

SaliCap® Set

IBL International, Hamburg

TECAN Genios

TECAN Crailsheim

Thermoval Rapid

Hartmann, Wr. Grimmenstein

Waage EMB 200-2

Kern & Sohn Gmbh, Balingen

Computerprogramme

MS Office

Microsoft, Hamburg

Magellan (Version 3.0)

TECAN Crailsheim

Universal ProbeLibrary Assay Design Center

<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=UP030000>

SPSS 15.0 für Windows PC

SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA

Oligo analyzer	http://eu.idtdna.com/analyzer/ Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Bioinformatic Harvester IV	http://harvester.fzk.de/harvester/
INTAS GDS	INTAS, Göttingen
RelQuant (Version 1.01)	Roche, Mannheim
LightCycler Software (3.5)	Roche, Mannheim

3.3 Methoden

Für die vorliegende Arbeit wurden auf verschiedene Weise Daten von Probanden erhoben. Hierzu zählte die Datenerhebung mit Hilfe verschiedener Fragebögen, die Messung anthropometrischer Daten und molekularbiologische Untersuchungen. Die angewandten Methoden sollen nachfolgend kurz beschrieben werden.

3.3.1 Fragebögen

Alle Fragebögen, die im folgenden genannt werden, wurden von den Studienteilnehmern in den Räumlichkeiten der Abteilung für Humanbiologie des Zoologischen Instituts der Christian Albrechts Universität zu Kiel ausgefüllt.

3.3.1.1 Allgemeiner Fragebogen

Der in dieser Studie verwendete allgemeine Fragebogen (Anhang A3) wurde in der Abteilung für Humanbiologie des Zoologischen Instituts der CAU Kiel erstellt. Er diente der allgemeinen Charakterisierung der Probanden. In 17 Fragen werden Informationen zu Alter, Geschlecht, Familienstand, Wohnsituation und Berufstätigkeit erfragt. Außerdem gibt der Proband Informationen zu seinem Gesundheitszustand bzw. Krankheitsstatus, seiner Medikamenteneinnahme und seinen Ernährungsgewohnheiten sowie eine Selbsteinschätzung seines Chronotyps.

Von den weiblichen Studienteilnehmerinnen wurde ein Zusatzteil ausgefüllt, der in weiteren vier Fragen nach Menopause und Hormoneinnahme (Hormonersatztherapie oder orale Kontrazeptiva) fragt.

3.3.1.2 Freiburger Fragebogen zur Bestimmung der körperlichen Aktivität

Der Freiburger Fragebogen zur körperlichen Aktivität (Anhang A4) wurde 1999 entwickelt (Frey et al. 1999). Dieser Fragebogen floss mit in diese Studie ein, weil in der Literatur vermutet wurde, dass körperliche Aktivität die Schlafqualität von Probanden positiv beeinflussen kann (Chen et al 2009, de Castro Toledo Guimaraes et al 2008, Tanaka et al 2002). Diese Aussage sollte in dieser Studie überprüft werden. Körperliche Aktivität ist

definiert als jegliche durch Muskelarbeit hervorbrachte Bewegung (Caspersen et al. 1985). Mit diesem Fragebogen wird der Aktivitätsgrad von Probanden hauptsächlich in Alltagssituationen abgefragt, da davon auszugehen ist, dass bereits Aktivitäten mit niedrigen bzw. moderaten Intensitäten wie Treppensteigen oder zügige Spaziergänge, von gesundheitlichem Nutzen sind (Frey et al. 1999, Pate et al 1995). Dadurch, dass sowohl alltägliche als auch sportliche Freizeitaktivitäten abgefragt werden, ist der Fragebogen zielgruppenunabhängig und gut für den Vergleich von unterschiedlichen Gruppen geeignet. In der ausführlichen Form besteht der Fragebogen aus zwölf Fragen, die sich auf die Bereiche „Intensität körperlicher Belastung während der Berufstätigkeit“, „Alltagsaktivitäten“, „Sportaktivitäten“, „Freizeitaktivitäten“ sowie „Umfang der täglichen Entspannungs- und Schlafphasen“ beziehen. Für diese Studie wurde die Kurzform des Fragebogens verwendet, die mit den ersten acht Fragen der längeren Version die körperliche Aktivität der Probanden abfragt. Der Umfang der täglichen Entspannungs- und Schlafphasen wird außer Acht gelassen.

Für die Auswertung des Fragebogens werden zunächst allen körperlichen Aktivitäten bestimmte Metabolische Äquivalente (metabolic equivalents), kurz METs, zugeordnet. Ein MET ist definiert als Verbrauch von einer Kilokalorie pro Stunde und pro Kilogramm Körpergewicht (Ainsworth et al. 1993, 2000). Dieser Wert entspricht etwa der metabolischen Rate des menschlichen Körpers während stillem Sitzen und ist der Standard, mit dem alle weiteren körperlichen Aktivitäten verglichen werden bzw. von dem alle weiteren MET-Zahlen abgeleitet werden. In einem Kompendium, das 1993 von Ainsworth et al. herausgegeben wurde, sind die für die Fragebogenauswertung nötigen MET-Werte angegeben. Das Kompendium wurde im Jahre 2000 erweitert (Ainsworth et al. 2000) und gibt Werte von 0,9 (Schlaf) bis 18 (schnelles Laufen) an. Aus allen von den Probanden angegebenen Aktivitäten und den zugehörigen MET-Werten wurde ein Aktivitätsumsatz bestimmt. Je höher dieser ist, desto größere körperliche Aktivität weist der Proband auf.

3.3.1.3 Morningness-Eveningness-Questionnaire (MEQ) zur Bestimmung des Chronotyps

Der Morningness-Eveningness-Questionnaire wurde von Horne und Östberg (1976) entwickelt. Dieser international verwendete Fragebogen erlaubt es, Menschen einem Chronotyp zuzuordnen. Unterschieden werden Morgentypen, Intermediärtypen und Abendtypen. In dieser Arbeit wurde die von Griefhahn für Deutschland validierte Version des Fragebogens (Griefhahn et al. 2001) verwendet (Anhang A7). In 19 Fragen wird ermittelt, zu welchen Tageszeiten der Proband am aktivsten ist und in welchen Zeiträumen seine präferierten Schlaf- und Wachzeiten liegen. Die Punkteskala reicht von 16 bis 86 Punkten, wobei die höchsten Punktzahlen bei Morgentypen und die niedrigsten bei den Abendtypen auftreten. Zwischen folgenden Gruppen kann unterschieden werden:

Definitiver Abendtyp:	≤ 30,9 Punkte
Moderater Abendtyp:	31,0 bis 41,9 Punkte
Neutraltyp:	42,0 bis 58,9 Punkte
Moderater Morgentyp:	59,0 bis 69,9 Punkte
Definitiver Morgentyp:	≥ 70,0 Punkte

3.3.1.4 Pittsburgh-Sleep-Quality-Index (PSQI)-Fragebogen zur Bestimmung der Schlafqualität

Der PSQI-Fragebogen (Anhang A5) wurde von Buysse et al. (1989) entwickelt und dient zur Erfassung der subjektiven Schlafqualität von Probanden. Die Studienteilnehmer beantworten 24 Fragen, die folgenden sieben Komponenten zugeordnet sind: subjektive Schlafqualität, Schlaflatenz, Schlafdauer, Schlafeffizienz, Schlafstörungen, Schlafmittelkonsum sowie Tagesschläfrigkeit. Angegeben werden auch Zubettgehzeit, Einschlafdauer, Aufstehzeit und Dauer des nächtlichen Schlafes. Alle Angaben des Probanden beziehen sich auf den Zeitraum der letzten vier Wochen vor dem Ausfüllen des Fragebogens. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe einer Excel-Datei. Es können maximal 21 Punkte erreicht werden. Bei null bis fünf Punkten wird der Proband der Gruppe „Gute In mehreren Studien (Buysse et al. 1989, Doi et al 2001, Wittchen et al. 2001) konnte nachgewiesen werden, dass dieser Fragebogen eine sehr gute Sensibilität, Spezifität und Reliabilität besitzt. Schläfer“ zugeordnet, bei sechs bis 21 Punkten der Gruppe „Schlechte Schläfer“.

In den Fällen, in denen Uhrzeiten aus diesem Fragebogen in die statistische Analyse eingingen, wurden die Uhrzeiten aus rechnerischen Gründen in Minuten umgerechnet. So entspricht beispielsweise die Uhrzeit „20 Uhr“ 1200 Minuten. Das Prinzip ist die Angabe der Minute des Tages. Geht ein Proband etwa um 22:15 Uhr ins Bett, so tut er dies in der 1335. Minute des Tages.

3.3.1.5 Epworth Sleepiness Scale (ESS)-Fragebogen zur Bestimmung der Tagesschläfrigkeit

Der ESS-Fragebogen (Anhang A6) wurde 1991 von M.W. Johns entwickelt (Johns 1991). Er erlaubt eine phänotypische Unterteilung in die Gruppen „Probanden mit Tagesschläfrigkeit“ und „Probanden ohne Tagesschläfrigkeit“. Hierbei wird die Tagesschläfrigkeit nicht direkt ermittelt, sondern der Proband muss für acht verschiedene Alltagssituationen angeben, wie hoch er die Wahrscheinlichkeit einschätzt, dass er in der beschriebenen Situation einschläft. Beispiele für die angegebenen Situationen sind „Im Sitzen lesend“ oder „Beim Fernsehen“. Der Proband kann die angegebenen Situationen mit den vier Wahrscheinlichkeiten „würde niemals einnicken“ (null Punkte), „geringe Wahrscheinlichkeit einzunicken (ein Punkt)“, „mittlere Wahrscheinlichkeit einzunicken (zwei Punkte)“ und hohe „Wahrscheinlichkeit

einzunicken (drei Punkte)“ bewerten. Insgesamt können also null bis 24 Punkte erreicht werden. Im Bereich von null bis zehn Punkten wird der Proband in die Gruppe „Probanden ohne Tagesschläfrigkeit“ eingeteilt und bei elf bis 24 Punkten der Gruppe „Probanden mit Tagesschläfrigkeit“ zugeordnet.

3.3.1.6 Seasonal Pattern Assessment Questionnaire (SPAQ) zur Erfassung der saisonalen Befindlichkeit

Der SPAQ-Fragebogen (Anhang A8) wird herangezogen, um die jahreszeitlichen Stimmungsveränderungen von Probanden zu ermitteln. Mit ihm kann auch auf eine jahreszeitliche Depression (Seasonal Affective Disorder, SAD) geschlossen werden. Der Fragebogen wurde von Rosenthal (Rosenthal et al. 1987) entwickelt. Anhand von drei Kriterien lassen sich Phänotypen mit jahreszeitlicher Depression (Winterdepression oder Sommerdepression) von Phänotypen ohne jahreszeitliche Depression unterscheiden (Kasper 1991). Als erstes Kriterium ist hier der Saisonalitätsscore (Global Seasonality Score, GSS) zu nennen. Er errechnet sich aus sechs Fragen zur jahreszeitlichen Veränderung hinsichtlich Befinden, sozialer Aktivität, Appetit, Schlafdauer, Gewichtsschwankungen, Energie und Stimmung. Die Antworten reichen von „keine Veränderung“, was null Punkten entspricht, bis „extreme Veränderung“. Dies entspricht vier Punkten. So können maximal 24 Punkte erreicht werden.

Das zweite Kriterium dieses Fragebogens bezieht sich auf gefühlte Probleme beim Jahreszeitenwechsel. Der Proband kann die Frage „Stellt der Wechsel der Jahreszeiten für Sie ein Problem dar?“ entweder verneinen (null Punkte) oder bejahen. Im Falle der Bejahung kann der Proband fünf Stärkegrade von „ja, gering“ (ein Punkt) bis „ja, invalidisierend“ (fünf Punkte) ankreuzen.

Für das dritte Kriterium muss der Proband für zehn Fragen angeben, in welchen Monaten er sich z.B. am wohlsten/schlechtesten fühlt, er am meisten/wenigsten isst, er die meisten/wenigsten sozialen Kontakte hat etc. oder ob kein Zeitraum herausragt. Durch die Zuordnung dieser Zustände zu Monaten entsteht ein „Fenster“, welches den Zeitraum einer möglichen jahreszeitlichen Depression anzeigt. Die Auswertung erfolgt nach den Kriterien, die von Kasper angegeben wurden (Kasper et al. 1989, Kasper et al. 1991). Eine SAD liegt demnach vor, wenn ein GSS ≥ 11 Punkten und eine Problemstärke ≥ 2 Punkten zusammen bei einem Probanden auftreten.

3.3.2 Körperkerntemperaturmessung

Die Messung der Körperkerntemperatur der Probanden erfolgte oral bzw. sublingual mit Hilfe des digitalen Thermometers „Thermoval Rapid“ der Firma Hartmann (Abb. 17) auf 0,1°C genau.

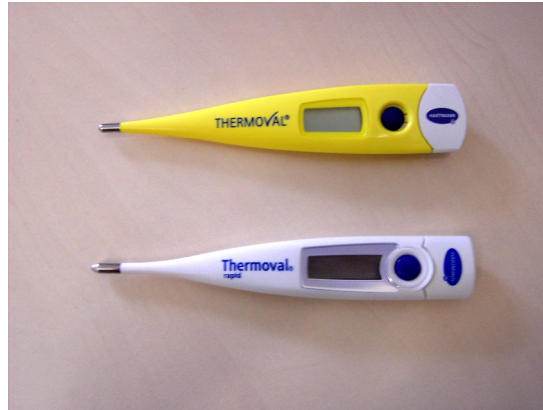


Abb. 17: Digitale Thermometer zur Messung der oralen Körpertemperatur von Probanden

Die Probanden wurden gebeten, sich das Thermometer unter ihre rechte Zungenseite zu legen und die Thermometerspitze möglichst weit hinten zu platzieren. Während der Messung sollten sie den Mund geschlossen halten. Das Messzeit-Ende wurde von dem Thermometer durch ein Tonsignal signalisiert.

Alle Messungen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. Für den Fall, dass die Messwerte mehr als 0,1 °C voneinander abwichen, wurde auch eine dritte Messung durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurde jeweils der Mittelwert der beiden Messungen verwendet. Die Messungen fanden jeweils um 08:00h, 12:00h und 16:00h statt. Von 16:00 Uhr bis 24:00 Uhr wurde die Körperkerntemperatur jeweils stündlich gemessen. Jeder Proband verwendete immer dasselbe Thermometer.

3.3.3 Antropometrie

Die Messung der Körperhöhe erfolgte mit Hilfe eines Anthropometers auf 0,1 cm genau.. Die Probanden wurden gebeten, sich ihre Schuhe auszuziehen und sich möglichst gerade an die Raumwand zu stellen. Es wurde darauf geachtet, dass der Kopf ebenfalls möglichst gerade gehalten wurde und die Füße zusammen standen. Das Gewicht wurde mit Hilfe einer Personenwaage der Firma Tanita auf 0,1 kg genau gemessen. Die Probanden trugen während der Messung leichte Bekleidung und keine Schuhe. Aus Körperhöhe und Körpergewicht wurde der Body Mass Index (BMI) berechnet. Hierzu wird das Gewicht in Kilogramm durch die Körperhöhe zum Quadrat geteilt:

$$\text{BMI} = \frac{\text{Gewicht in kg}}{(\text{Körperhöhe in m})^2}$$

3.3.4 Probensammlung

Für diese Arbeit wurden den teilnehmenden Probanden Mundschleimhaut- und Speichelproben entnommen, um Hormon- und Gen-Analysen durchzuführen. Es gab mehrere Gründe für die Entscheidung, diese Gewebe statt Blut, das klassischerweise untersucht wird, zu verwenden. Eine Blutabnahme ist ein invasiver Eingriff, der vielen Probanden unangenehm ist. Grundsätzlich ist ein möglichst schonendes Vorgehen zu präferieren. Diese Studie wurde von der Autorin, einer Biologin, durchgeführt. Grundsätzlich ist es Biologen nicht gestattet, Blut abzunehmen. Die Verwendung von Blut hätte also die Mitarbeit eines Mediziners oder einer ausgebildeten Krankenschwester, Artzhelferin o.ä. erfordert. Einige Hormone, wie auch das Cortisol, liegen im Blut hauptsächlich in gebundener Form vor. Bei der im Speichel vorhandenen Cortisol-Fraktion handelt es sich hingegen um die ungebundene, und damit biologisch aktive, Form des Hormons. Bei der Verwendung von Speichel erhält man demnach direkte und exakte Ergebnisse, sodass der Speichel ist dem Blut vorzuziehen ist (Shirtcliff 2001).

Die Tatsache, dass humane Gene auch in der Mundschleimhaut im circadianen Rhythmus exprimiert werden, konnte bereits nachgewiesen werden (Bjarnasson 2001). Aus diesem Grund, und weil auch die Abnahme von Mundschleimhaut nicht-invasiv erfolgen kann, wurde dieses Gewebe als Grundlage für die Genexpressions-Analysen verwendet.

Speichelsammlung für Hormonanalysen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden quantitative Analysen der Hormone Cortisol und Melatonin anhand von Speichelproben durchgeführt. Zur Speichelsammlung wurde das SaliCap-System der Firma IBL International verwendet. Bei diesem System leitet der Proband seinen Speichel durch einen Strohhalm in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß (Abb. 18), und verschließt den Deckel anschließend. Ein Beschriftungsetikett gehört ebenfalls zum Lieferumfang. Die Speichelsammlungen für die Cortisol- bzw. Melatonin-Analysen erfolgten stets an zwei aufeinander folgenden Tagen.

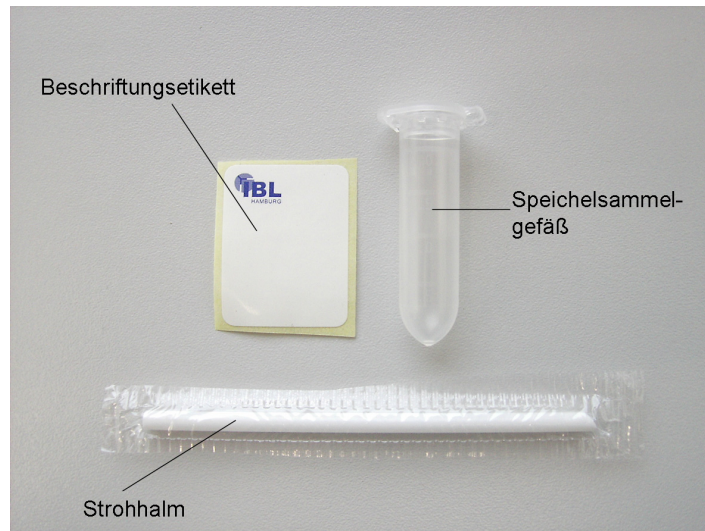


Abb. 18: SaliCap-Set zur Speichelsammlung

Cortisol-Morgenprofil

Um ein Cortisol-Morgenprofil erstellen zu können, bei dem die Cortisol-Aufwach-Reaktion (Cortisol-Awakening-Response, CAR) dokumentiert werden kann, ist es nötig, dass der Proband direkt nach dem Aufwachen bei sich zuhause im Bett mit der Speichelsammlung beginnt. Um dies gewährleisten zu können, kam jeder Proband einige Tage vor dem Sammlungstermin in die Abteilung für Humanbiologie. Hier wurde ihm die Durchführung einer Speichelsammlung erklärt und fünf vorbereitete SaliCaps mit Strohhalmen ausgehändigt.

Jeder Proband sammelte am vereinbarten Tag morgens direkt nach dem Aufwachen (T0), und dann im Abstand von 15 min. (T15, T30, T45, T60) vier weitere Speichelproben von sich selbst. Jeder Proband wurde dazu angehalten, sich an dem Morgen grundsätzlich wie immer zu verhalten. Hierzu gehörte das Einhalten der gewöhnlichen Weck- und Aufstehzeit, der selbe Zeitpunkt der morgendlichen Dusche etc. Die einzige Einschränkung sollte darin bestehen, während der Zeit der Speichelsammlung nicht zu essen und auch nicht die Zähne zu putzen, um eine Beeinflussung der späteren Hormonanalyse durch Verunreinigungen zu vermeiden. Die Probanden wurden gebeten, die Sammlungsgefäße nach dem Befüllen mit ihrem Speichel in einen, ihnen ebenfalls ausgehändigten, verschließbaren Plastikbeutel zu geben, diesen bis zum nächsten Tag in ihrem Kühlschrank aufzubewahren, und ihn dann in die Abteilung für Humanbiologie mitzubringen.

Melatonin-Abendprofil

Die Probensammlung für das Melatonin-Abendprofil der Probanden fand am Untersuchungstag statt. Der Proband leitete wiederum seinen Speichel durch einen Strohhalm in das SaliCap-Gefäß. Diesmal erfolgte die Speichelsammlung abends im Zeitraum von 16:00 bis 24:00 Uhr stündlich jeweils zur vollen Stunde. Die Probanden hielten

sich während dieses gesamten Zeitraums in einem separaten Raum auf. Wie bereits dargelegt wurde, wird die Melatoninproduktion des Körpers durch Lichtsignale gesteuert, die über die Retina des Auges aufgenommen werden. Um zu vermeiden, dass das Raumlicht einen Einfluss auf die Melatoninproduktion der Probanden ausübte, befanden sich die Probanden im Zeitraum von 16 bis 24 Uhr in einem abgedunkelten Raum, in dem die Lichtintensität auf ≤ 10 lx eingestellt war. Die Messung der Lichtintensität erfolgte mit Hilfe eines Luminometers.

Sammlung von Mundschleimhaut für molekulargenetische Analysen

Für die molekulargenetischen Untersuchungen, die im Rahmen dieser Studie durchgeführt wurden, wurde RNA aus Mundschleimhautzellen extrahiert. Für die Probensammlung wurde den Probanden 40 ml kalte isotone Kochsalzlösung in einem Plastikbecher gereicht. Die Studienteilnehmer nahmen daraufhin etwa die Hälfte der Flüssigkeit in den Mund und spülten diesen 30 s lang möglichst kräftig aus, um so Mundschleimhautzellen abzulösen. Nach Ablauf der Zeit gaben sie die Flüssigkeit in ein 50ml Zentrifugenröhrchen und wiederholten den Vorgang mit der zweiten, im Becher verbliebenen, Hälfte der Kochsalzlösung. Dieser komplette Vorgang wurde zweimal durchgeführt, um pro Proband und Zeitpunkt zwei Mundschleimhautproben zur Verfügung zu haben. Im Anschluss wurden die Mundschleimhautzellen für fünf Minuten bei 4°C und 450 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Sediment in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Um möglichst viel Überstand entfernen zu können, wurde dieses Gefäß wiederum zentrifugiert. Diesmal dauerte dieser Schritt zwei Minuten und fand bei 4°C und 1200 g statt. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen.

Um mucöse Inhaltsstoffe der Mundschleimhaut zu zerstören und somit die Ergebnisse der anschließenden RNA-Extraktion zu verbessern, wurde das eine Sediment, das direkt weiterverarbeitet werden sollte, nun für mindestens 30 min. bei -20°C eingefroren. Das zweite Sediment wurde bei -80°C gelagert, um es zu einem späteren Zeitpunkt verwenden zu können.

Übersichtsplan der Probensammlungen

Aus den oben beschriebenen Probennahmen ergibt sich folgendes Übersichts-Schema:

- 1.Tag: Speichelsammlung für das morgendliche Cortisol-Aufwach-Profil der Probanden zuhause in der ersten Stunde nach dem Erwachen.
- 2.Tag: Durchführung von Temperaturmessungen, Speichelsammlungen und Mundschleimhaut-Sammlungen.

Die Tabelle 3 gibt einen Überblick darüber, zu welchem Zeitpunkt des zweiten Tages welche Probe gesammelt wurde bzw. welche Messung wann durchgeführt wurde.

Tab. 3 Überblick über Messzeitpunkte und Probensammlungen am Probandentag

Uhrzeit	Durchgeführtes Prozedere/ genommene Proben
8.00	Körperkerntemperatur-Messung Mundschleimhaut-Probe Ausfüllen der Fragebögen
9.00	Zeit für Probanden zur freien Verfügung
10.00	
11.00	
12.00	Körperkerntemperatur-Messung Mundschleimhaut-Probe
13.00	Zeit für Probanden zur freien Verfügung
14.00	
15.00	
16.00	Ab diesem Zeitpunkt Zeit in abgedunkeltem Raum mit einer Lichtstärke von $\leq 10\text{lx}$ verbringen Körperhöhe messen Proband wiegen Körperkerntemperatur-Messung Speichelprobe Mundschleimhaut-Probe
17.00	Körperkerntemperatur-Messung Speichelprobe
18.00	Körperkerntemperatur-Messung Speichelprobe
19.00	Körperkerntemperatur-Messung Speichelprobe
20.00	Körperkerntemperatur-Messung Speichelprobe Mundschleimhaut-Probe
21.00	Körperkerntemperatur-Messung Speichelprobe
22.00	Körperkerntemperatur-Messung Speichelprobe Mundschleimhaut-Probe
23.00	Körperkerntemperatur-Messung Speichelprobe
24.00	Körperkerntemperatur-Messung Speichelprobe Mundschleimhaut-Probe

3.3.5 Molekularbiologische Methoden

Während dieser Arbeit wurden sowohl relative Quantifizierungen von Zielgen-Expressionen durchgeführt, als auch die Konzentrationen von Hormonen im Speichel bestimmt.

Für die relative Quantifizierung wurden zunächst zwei Verfahren für die Extraktion von RNA aus Mundschleimhaut etabliert. Im Anschluss daran wurde getestet, welches cDNA-Kit sich am besten dazu eignete, die gewonnene RNA in cDNA umzuschreiben. Mit der synthetisierten cDNA konnten anschließend Echtzeit (Real Time)- PCRs auf dem

LightCycler® durchgeführt werden, bei denen das ebenfalls etablierte Universal Probe Library (UPL)-Sondensystem Anwendung fand. Nach der Erstellung von Standardkurven und Coefficient-Files erfolgte die Relative Quantifizierung schließlich mit Hilfe des Programms RelQuant.

Die Bestimmung der Hormonkonzentration im Speichel erfolgte mit Hilfe von Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assays (ELISAs). Die Etablierung der dafür verwendeten Kits war ebenfalls Bestandteil dieser Arbeit.

Im folgenden Teil sollen sowohl die Methodengrundlagen und Etablierungsschritte, als auch die schließlich verwendeten Protokolle dargelegt werden.

3.3.5.1 RNA-Extraktion

Etablierung

Bevor festgelegt wurde, mit welcher Methodedie RNA aus Mundschleimhautzellen gewonnen werden sollte, die den Gen-Expressionsanalysen zugrunde lag, wurden mehrere Varianten miteinander verglichen. Einerseits wurden verschiedene Kits getestet, andererseits wurden die Ergebnisse der RNA-Extraktion mit dem am besten geeigneten Kit mit der Phenol-Chloroform-Extraktion verglichen.

Zunächst wurde mit insgesamt acht verschiedenen RNA-Extraktions-Kits von sechs verschiedenen Firmen (Tab. 4) versucht, RNA aus Mundschleimhaut zu extrahieren.

Tab. 4: Getestete RNA-Isolierungs Kits

Name des Kits	Hersteller
Crystal RNA Mini Kit	Biolab
Total RNA Isolation	Macherey Nagel
NucleoSpin® RNA L	Macherey Nagel
PureYield™ RNA Midiprep System	Promega
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
RNeasy® Plus Mini Kit	Qiagen
High Pure RNA Isolation Kit	Roche
Absolutely RNA Miniprep	Stratagene

Grundsätzlich wurde das Hersteller-Protokoll bei der ersten Extraktion strikt eingehalten. Nach der Extraktion wurde die Konzentration und Reinheit der erhaltenen RNA mit Hilfe des Biophotometers von Eppendorf überprüft. Zusätzlich wurden 10 µl der RNA auf ein einprozentiges Agarosegel aufgetragen und nach einer Gelelektrophorese unter UV-Licht betrachtet. Es wurde darauf geachtet, wie stark das Signal insgesamt war, ob die 18S- und 28S rRNA-Banden deutlich erkennbar waren, und wie ausgeprägt die ganz oben befindliche

genomische DNA (gDNA)-Bande war. Eine Abbildung hierzu findet sich im Ergebnisteil (Kap. 4.1.2.1).

Von den verwendeten Kits war keines ausdrücklich vom Hersteller für RNA-Extraktionen aus Mundschleimhaut vorgesehen. Deshalb wurde das jeweilige Protokoll im Anschluss an die Extraktion nach Herstellerangaben nochmals verschiedentlich abgewandelt, um eine evtl. höhere RNA-Ausbeute zu erzielen. Hierbei wurden Parameter wie Zentrifugationszeiten und -stärken verändert, aber auch der Zellaufbruch wurde auf verschiedene Weisen durchgeführt. So wurde die Effektivität des Zellaufbruchs durch vortexen, mit Hilfe von „QiaShreddern“ und durch Aufziehen des Lysats mit einer Spritze durch eine Kanüle getestet.

Weiterhin wurde verglichen, ob es zu einer unterschiedlichen RNA-Ausbeute führt, wenn der Proband seinen Mund mit Leitungswasser oder mit isotoner Kochsalzlösung ausspült, um die Mundschleimhautzellen zu lösen.

Es zeigte sich, dass das „CRYSTAL RNA Mini Kit“ der Firma Biolab am besten für die RNA-Extraktion aus Mundschleimhaut geeignet war, weil es zu der höchsten RNA-Ausbeute mit der höchsten Reinheit führte.

RNA-Extraktion mit dem CRYSTAL RNA Mini Kit

Für die Extraktion von Gesamt-RNA aus Mundschleimhaut wurde das CRYSTAL RNA Mini Kit der Firma Biolab verwendet. Die Firma gibt in ihren Protokollen Umdrehungszahlen statt die relative Zentrifugalbeschleunigung an. Bei allen Angaben, die im Folgenden in „Umdrehungen pro Minute“ (U/min) gemacht werden, handelt es sich demnach um Herstellerangaben.

Das wie unter 3.3.4 beschrieben erhaltene Sediment wurde zunächst wieder aufgetaut. Um die Zellmembranen aufzubrechen, wurden 600 µl Lysepuffer zugegeben, und das Pellet mit der Pipette gelöst. Der Puffer wirkte zwei Minuten lang auf die Zellen ein. Der eigentliche Zellaufbruch wurde durch fünfmaliges Auf- und Abziehen der Flüssigkeit in einer 5 ml-Spritze mit einer Kanüle erreicht, die 70 mm lang war und einen Außendurchmesser von 0,9 mm aufwies. Hierbei war darauf zu achten, dass möglichst wenig Schaum entstand, da die Oberflächenspannung der Blasen zu einem Scheren der RNA-Moleküle führen könnte. Nach weiteren drei Minuten wurde das Gefäß zwei Minuten lang bei 4°C und 1200 g zentrifugiert, um Zelldebris zu entfernen. 600 µl des Überstands wurden auf die Säule D überführt und diese bei Raumtemperatur und 12.000 U/min zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen, und 900 µl Ethanol (70%) zu dem Durchfluss zugegeben. In zwei Schritten wurde das Gemisch auf die Säule R pipettiert, und es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Dieser fand wiederum bei Raumtemperatur und 12.000 U/min statt, und dauerte zwei Minuten. Die nun auf der Säule befindliche RNA wurde mit zwei verschiedenen Waschpuffern gewaschen. Zunächst wurden 500 µl des Waschpuffers HS mit hoher Salzkonzentration auf die Säule

gegeben, und diese bei Raumtemperatur und 12.000 U/min für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule in ein neues Auffanggefäß gegeben. Im Anschluss wurde ein Waschschrift mit dem Puffer LS (niedrige Salzkonzentration) unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Wiederum wurde der Durchfluss verworfen und die Säule in ein neues Auffanggefäß gegeben. Um möglichst alle Reste des Puffers zu entfernen, schloss sich ein weiterer zweiminütiger Zentrifugationsschritt bei Raumtemperatur und 12.000 U/min an. Zur Elution wurde die Säule zunächst in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. 40 µl RNase-freies Wasser wurde auf die Säule pipettiert, und für eine Minute bei Raumtemperatur einwirken lassen. Im Anschluss wurde das Eluat durch eine einminütige Zentrifugation bei 8000 U/min und Raumtemperatur gewonnen und sofort gekühlt.

RNA-Extraktion mittels Phenol-Chloroform-Extraktion

In den Fällen, in denen die Extraktion der Gesamt-RNA aus Mundschleimhaut mit dem Crystal RNA Mini Kit nicht erfolgreich war, wurde am zweiten, ebenfalls wie in 3.3.4 beschrieben gewonnenen Sediment, eine RNA-Extraktion mittels Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Diese hat den Vorteil, relativ hohe Ausbeuten zu erbringen. Allerdings ist die Reinheit der extrahierten RNA häufig nicht so hoch wie bei RNA, die mit dem CRYSTAL RNA Mini Kit der Firma Biolab extrahiert wurde.

Zur Lyse der Zellen wurde 1 ml TRI[®] Reagent BD auf das aufgetaute Mundschleimhaut-Pellet gegeben und gevortext, bis keine zusammenhängenden Zellverbände mehr erkennbar waren. Nach einer anschließenden fünfminütigen Einwirkzeit bei Raumtemperatur wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und beide Fraktionen für 15 Sekunden miteinander vermischt, um das im TRI Reagent BD enthaltene Phenol zu entfernen.

Im Anschluss an weitere fünf Minuten Inkubation wurde eine Sedimentation des Zelldebris durch eine 15 Minuten dauernde Zentrifugation bei einer Temperatur von 4°C und 12.000 g erreicht. Die die RNA enthaltende wässrige obere Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und die RNA gefällt. Hierzu wurden zunächst 667 µl Isopropanol hinzugegeben und das Gemisch für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch einen weiteren zehnminütigen Zentrifugationsschritt bei 4°C und 12.000 g wurde die RNA sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einem Milliliter Ethanol (75%) gewaschen. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 7.500 g und 4°C wurde der Überstand entfernt und das die Gesamt-RNA enthaltende Sediment nach Lufttrocknung in 40 µl H₂O für HPLC aufgenommen.

Die Konzentration der RNA wurde mit Hilfe eines Eppendorf Biophotometers bestimmt. Um einer Degradation der RNA vorzubeugen, wurde ein Mikroliter „Ribolock Ribonuclease Inhibitor“ der Firma Fermentas zugegeben.

3.3.5.2 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Die Bestimmung von Nucleinsäure-Konzentrationen erfolgte photometrisch nach Herstellerangaben im Biophotometer von Eppendorf (Verdünnung 1:59). Das Gerät misst die Absorption der Lösung bei 230 nm (Adsorptionswellenlänge von Polysacchariden, Phenol etc.), 260 nm (Adsorptionswellenlänge von Nucleinsäuren), 280 nm (Adsorptionswellenlänge von Proteinen) und 320 nm. Letztgenannte Wellenlänge dient als Korrekturfaktor. Anhand der gebildeten Verhältnisse der Adsorptionswerte können Rückschlüsse auf die Reinheit der gemessenen Probe gemacht werden. Bei der Konzentrationsmessung von extrahierter RNA wurde eine 260/280-Ratio von 1,8 bis 2,0 angestrebt, um die RNA zur cDNA-Synthese einzusetzen.

3.3.5.3 Enzymatische Spaltung mit dem Enzym DNaseI

Um mögliche DNA-Kontaminationen der extrahierten RNA zu beseitigen, wurde eine mit Hilfe des Enzyms Deoxyribonuclease I (DNaseI) aus dem „RNase-free Kit“ der Firma Fermentas eine enzymatische Spaltung durchgeführt. Hierfür wurde jenes Volumen RNA-Eluat in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß überführt, das möglichst zwei Mikrogramm RNA enthielt. Hinzugegeben wurden zwei Mikroliter 10x Reaction Buffer sowie zwei Mikroliter DNaseI-Enzym und ein Mikroliter Ribolock Ribonuclease Inhibitor. Letzteres diente dem Schutz der RNA vor Degradierung. Das Volumen wurde mit Wasser auf 18 µl aufgefüllt und 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Um das Enzym wieder zu deaktivieren, wurden nach dieser Zeit zwei Mikroliter EDTA (25 mM) zugegeben und das Gemisch zehn Minuten lang bei 65°C gehalten, um es dann sofort auf Eis zu stellen.

3.3.5.4 Synthese von komplementärer DNA (cDNA) durch reverse Transkription

Bei cDNA handelt es sich um DNA-Moleküle, die mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase mit RNA als Matrize synthetisiert wurden. Die cDNA eignet sich aus folgendem Grund besonders gut zur Expressionsanalyse: Bei der Transkription katalysiert das Enzym RNA-Polymerase die Synthese eines RNA-Moleküls, indem sie einen Strang genomischer DNA (gDNA) als Matrize abliest. Der entstandene Strang wird posttranskriptional durch Spleißen bearbeitet, und die so entstandene messenger RNA (mRNA) spezifiziert die Aminosäuresequenz eines Proteins. Das bedeutet, dass man anhand der vorhandenen mRNA-Menge in bestimmten Zellen oder Geweben darauf zurückschließen kann, welche Gene dort zu einem bestimmten Zeitpunkt wie stark exprimiert wurden. Diesen Fakt nutzt man, um die Expression von Genen zu untersuchen. Das Enzym Reverse Transkriptase ist in der Lage, die mRNA wieder in DNA umzuschreiben. Je mehr mRNA vorher vorlag, desto mehr cDNA wird synthetisiert. Außerdem ist die cDNA wesentlich kürzer als die gDNA desselben Gens, weil die Exons nach der Transkription aus der RNA herausgespleißt

wurden, und somit auch nicht von der Reversen Transkriptase „rücktranskribiert“ werden können.

Etablierung von cDNA-Synthese mittels reverser Transkription

Im ersten Schritt wurde eine cDNA-Synthese etabliert. Hierzu wurden fünf verschiedene cDNA-Synthese-Kits von vier verschiedenen Herstellern (Tab. 5) getestet. Um die Reaktion nicht durch unterschiedliche RNA-Ausgangsmengen zu beeinflussen, wurde in mehreren Versuchen jeweils die gleiche Menge RNA eingesetzt, die zuvor enzymatisch mit Hilfe der DNaseI gespalten worden war. Das Protokoll des jeweiligen Herstellers wurde eingehalten. Das jeweils gleiche Volumen der synthetisierten cDNA wurde auf ein einprozentiges Agarosegel aufgetragen. Anhand der Bandenstärke wurde bewertet, mit welchem Kit die besten Resultate erzielt werden konnten.

Tab. 5: Getestete cDNA-Synthese Kits und deren Herstellerfirmen

Name des Kits	Hersteller
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen
QuantiTect® Reverse Transcription	Qiagen
Transcriptor First strand cDNA Synthesis Kit	Roche
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Sample Kit	Roche

Es zeigte sich, dass das „Transcriptor First strand cDNA Synthesis Kit“ der Firma Roche am besten zur cDNA-Synthese geeignet war. Dieses Kit beinhaltet sowohl Random-Hexamer-Primer, als auch Anchored-oligo(dT)₁₈-Primer. Es bietet die Möglichkeit, die Primer gleichzeitig in einem Ansatz zu verwenden, oder eine Primerart auszuwählen. Random-Hexamer-Primer bestehen aus sechs Nucleotiden von zufälliger Reihenfolge. Sie binden dementsprechend an vielen verschiedenen Stellen entlang der kompletten RNA. Dies ermöglicht eine einheitliche Synthese aller RNA-Abschnitte der eingesetzten RNA. Die Anchored-oligo(dT)₁₈-Primer bestehen aus 18 Nucleotiden, von denen die ersten beiden zufällig sind, die folgenden 16 Thyminidine. Durch diesen Aufbau lagern sich die Primer am Poly-A-Schwanz der mRNA an. Dies ermöglicht eine spezifische Synthese von cDNA, die einer kompletten mRNA entspricht (Bedienungsanleitung Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit). Beide Primerarten haben also Vorteile. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese kombiniert, indem stets beide Primer-Arten zur Synthese von cDNA verwendet wurden. Weiterhin weist das in diesem Kit genutzte Enzym „Transcriptor RTase“ eine RNase-H-Aktivität auf. Das bedeutet, dass das Enzym die RNA, die es als Matritze für die

cDNA-Synthese abgelesen hat, im Anschluss daran selbst schneidet. Hierdurch wird die Gefahr negativer Beeinflussungen der PCR durch verbliebene RNA-Moleküle minimiert.

cDNA-Synthese mit dem Transcriptor First strand cDNA Synthesis Kit

Zur Herstellung von cDNA wurde das „Transcriptor First strand cDNA Synthesis Kit“ der Firma Roche verwendet.

Abhängig von der RNA-Konzentration, die für die enzymatische Spaltung mit Hilfe der DNaseI eingesetzt wurde, wurde ein Volumen enzymatisch gespaltener Gesamt-RNA für die c-DNA-Synthese verwendet. Es wurde auf die möglichst gleiche Einsatzmenge geachtet, um Unregelmäßigkeiten in der Effizienz der Synthese vorzubeugen, die durch unterschiedliche Einsatzmengen entstehen können. Diesem Volumen wurden zwei Mikroliter Anchored-oligo(dT)₁₈ Primer sowie vier Mikroliter Random-Hexamer-Primer zugegeben, und der Ansatz mit Wasser auf 26 µl aufgefüllt. Es schloss sich ein zehnminütiger Denaturierungsschritt bei 65°C an. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Ansatz sofort auf Eis gestellt. Nun erfolgte die Zugabe von acht Mikrolitern Transcriptor First strand Synthesis-Puffer, einem Mikroliter RNase Inhibitor, vier Mikrolitern dNTPs mit einer Konzentration von jeweils 10mMol und einem Mikroliter Reverse Transcriptase. So ergab sich ein Gesamtvolumen von 40 µl. Sämtliche Reagenzien entstammten dem Kit und wurden bereits in der zu verwendenden Konzentration geliefert. Es waren also keine Verdünnungsschritte o.ä. nötig. Der 40 l-Ansatz wurde mit der Pipette durchmischt, und kurz zentrifugiert. Es folgten drei Inkubationsschritte: Zunächst wurde der Ansatz zehn Minuten lang bei 25°C gehalten, dann 30 min. lang bei 55°C. Schließlich erfolgte eine fünf Minuten dauernde Hitze-Inaktivierung des Enzyms bei 85°C. Im Anschluss daran wurde der Ansatz sofort auf Eis gestellt, und bis zur weiteren Verwendung im Rahmen einer Erfolgskontrolle auf einem Agarose-Gel oder der Nutzung in einer PCR bei -20°C eingefroren.

3.3.5.5 Polymerasekettenreaktion (PCR) und Echtzeit (Real Time)-PCR

Da während dieser Arbeit mehrere verschiedene PCR-Typen angewendet wurden, soll an dieser Stelle zunächst die Erklärung einer Standard-PCR erfolgen, um ein besseres Verständnis der abgewandelten PCR-Formen zu ermöglichen.

Standard-PCR

Die PCR ist eine molekularbiologische Standardmethode, die der exponentiellen Amplifikation von definierten DNA-Fragmenten dient. Sie wurde 1987 von Mullis und Faloona entwickelt (Mullis und Faloona 1987). Das Prinzip der PCR beruht auf der wiederholten Abfolge der drei Schritte Denaturierung, Anlagerung (Annealing) und Elongation. Gewöhnlich beginnt die PCR mit einem initialen Denaturierungsschritt bei etwa 95°C. Während dieses Schritts trennen sich die DNA-Doppelstränge zu Einzelsträngen auf.

Im zweiten Schritt lagern sich zwei sequenzspezifische Oligonukleotide (Primer) jeweils an ein Ende der vorher bestimmten Sequenz an einem der beiden Einzelstränge an. Für die Anlagerungsphase wird eine Temperatur gewählt, die etwa ein bis fünf Grad Celsius unter der Schmelztemperatur der Primer liegt. Die Schmelztemperatur (Meltingtemperature, T_m) ist die Temperatur, bei der 50% der Oligonukleotide nicht an die DNA gebunden sind. Sie hängt ab von der Länge, der Basenzusammensetzung und der Basenabfolge innerhalb des Moleküls (Breslauer et al. 1986). Der dritte Schritt, die Elongation, findet bei einer Temperatur von 72°C statt. Hierbei lagert sich das hitzestabile Enzym Taq-Polymerase, das ursprünglich aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* stammt, zunächst an den Primern an, und beginnt dann, dNTPs komplementär zum Matrizen-Strang anzufügen. So entsteht ein zweiter, komplementärer, Strang. Die Dauer der Elongationsphase hängt u.a. ab von der Größe des Amplikons. Je länger das Amplikon ist, desto länger dauert die Elongationsphase. Durch die wiederholte Abfolge dieser drei Schritte wird also theoretisch die Kopien-Anzahl eines Amplikons während jedes Zykluses verdoppelt und so eine exponentielle Replikation von definierten DNA-Sequenzabschnitten ermöglicht. Die Anzahl der Kopienzahl kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$N = N_0 \times 2^n$$

Wobei N = Kopienzahl nach n Zyklen

N_0 = Anzahl der Ausgangskopien zu Beginn der PCR

n = Anzahl der durchgeführten PCR-Zyklen

Eine PCR lässt sich in nachfolgend beschriebene drei Phasen einteilen. Während der Hintergrundphase einer PCR ist die Menge des Amplifikats noch sehr gering. Versucht man beispielsweise, die PCR-Produkte mit Hilfe von fluoreszierenden Farbstoffen nachzuweisen, so wird das Fluoreszenz-Signal des PCR-Produkts zu diesem Zeitpunkt noch von Hintergrundsignalen überdeckt. Während der anschließenden Log-Phase erfolgt ein exponentieller Anstieg der Amplikonmenge und somit auch der Fluoreszenzsignal-Stärke.

Wenn die PCR die Plateauphase erreicht, sind die Reaktionskomponenten verbraucht und die Reaktion kommt zum Erliegen (Abb. 19).

Wieviele Wiederholungen der PCR-Zyklen nötig sind, hängt davon ab, wie häufig eine zu amplifizierende Sequenz in dem Template vorhanden ist. Je seltener sie vorkommt, desto mehr Zyklen sind notwendig, um das Amplifikat beispielsweise auf einem Agarosegel sichtbar machen zu können. Eine übertrieben hohe Anzahl von Zyklen ist jedoch nicht hilfreich, da ab einem bestimmten Zeitpunkt alle in dem Ansatz enthaltenen dNTPs, Primer

etc. bereits in Amplifikate eingefügt sind, und eine weitere Wiederholung von PCR-Zyklen kein neues PCR-Produkt mehr bringt (Plateauphase, s.o.).

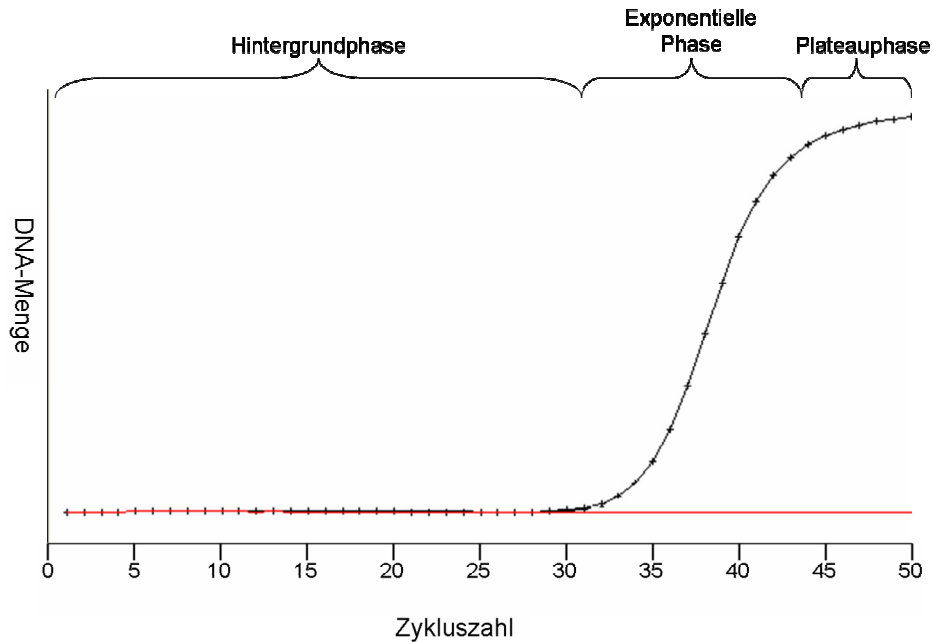


Abb. 19: Phasen einer PCR. Dargestellt ist die Entwicklung der DNA-Menge im Laufe von 50 PCR-Zyklen. Die schwarze Kurve beschreibt die DNA-Menge in einem Ansatz mit DNA als Matrize. Während der Hintergrundphase ist die Amplikon-Menge noch sehr gering. Ab einem bestimmten Zeitpunkt wird die exponentielle Phase erreicht, die Amplikon-Menge steigt innerhalb weniger Zyklen stark an. Wenn die Plateauphase erreicht wird, flacht die Kurve sehr stark ab. Zu diesem Zeitpunkt sind bereits so viele DNA-Kopien im Ansatz vorhanden, dass einerseits Endprodukte miteinander akkumulieren, andererseits die Menge der noch vorhandenen freien Nucleotide abnimmt, und die PCR-Reaktion dadurch gehemmt ist. Rot dargestellt ist der Verlauf einer Leerprobe, in der keine Kopienzahl-Zunahme zu verzeichnen ist

Ein Schema für einen Standard-PCR-Ansatz ist in Tabelle 6 abgebildet. Tabelle 7 zeigt ein Standard-PCR-Programm.

Tab. 6: Standard-Rezept für einen 50 µl PCR-Ansatz

Menge (µl)	Komponente
40,1	H ₂ O
5	10x PCR Puffer
0,5	dNTPs (c = 100 mM)
1	Vorwärtsprimer (c = 10 pmol/µl)
1	Rückwärtsprimer (c = 10 pmol/µl)
0,4	Taq-Polymerase
2	Template (z.B. cDNA)
50 µl Gesamtvolumen	

Tab. 7: Programm für eine Standard-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer	
Deckeltemperatur	99°C	dauerhaft	
Initiale Denaturierung	95°C	5 bis 10min	
Denaturierung	95°C	30sec	36x
Annealing	Primerabhängig	30sec	
Elongation	72°C	30sec	
Finale Elongation	72°C	5 bis 10min	
Kühlung	4°C	dauerhaft	

Die in dieser Arbeit verwendeten Anlagerungstemperaturen sind in Tabelle 8 aufgeführt. Da es nicht möglich ist, bei der Programmierung des LightCyclers Kommazahlen bei der Eingabe der Anlagerungstemperatur zu wählen, wurden hier stets ganze Gradzahlen verwendet.

Tab. 8: Übersicht über Anlagerungstemperaturen von Oligonukleotiden während Blockcycler-PCR und LightCycler-PCR

Gen	Anlagerungstemperatur bei Blockcycler-PCR (°C)	Anlagerungstemperatur bei LightCycler-PCR (°C)
<i>hBMAL1:</i>	54,4	55°C
<i>hPER1:</i>	56,5	57°C
<i>h36B4:</i>	56,5	57°C
<i>hGAPDH:</i>	55,2	56°C
<i>hHPRT:</i>	55,2	55°C

Neben Standard-PCRs wurden während dieser Arbeit weitere PCR-Typen durchgeführt. Diese sollen nachfolgend beschrieben werden.

Gradienten-PCR

Bei einer Gradienten-PCR handelt es sich um eine Abwandlung der Standard-PCR, bei der während der Anlagerungsphase ein Temperatur-Gradient über dem metallischen Heizblock liegt. Hierdurch kann beispielsweise getestet werden, bei welcher genauen Temperatur ein bestimmtes Primerpaar das beste Ergebnis liefert.

Heißstart (Hotstart)-PCR

Herkömmliche thermostabile DNA-Polymerasen arbeiten auch unter nicht-optimalen Bedingungen, d.h. auch bei Temperaturen, die unter der eigentlichen Elongationstemperatur liegen. So kann es schon vor dem eigentlichen Beginn der Elongationsphase zur

unspezifischen Bindung der Primer an die Template DNA kommen. Wenn das geschieht, ist die Amplifikation unspezifischer Fragmente die Folge. Um dies auszuschließen, kann man eine Heißstart-Taq-Polymerase verwenden. Bei dieser ist ein Antikörper an die DNA-erkennende Domäne der Polymerase gebunden, wodurch die Bindung an die Template DNA verhindert wird. Der Antikörper löst sich während der initialen Denaturierung des PCR-Ansatzes von dem Enzym ab, wenn eine Temperatur von 95°C erreicht wird. Die Amplifikation kann somit erst nach Erreichen dieser Mindesttemperatur beginnen und die Wahrscheinlichkeit einer Artefaktbildung durch unspezifische Primerbindung wird verringert.

Quantitative Echtzeit (Real Time)-Reverse Transkription (RT)-PCR

Für die in dieser Arbeit auf dem LightCycler® durchgeführten PCRs wurde, wie bereits beschrieben, zunächst RNA aus Mundschleimhaut extrahiert, und diese dann in cDNA umgeschrieben (Reverse Transkription). Die cDNA diente als Matrize für die PCRs. Dies ist die Voraussetzung für eine RT-PCR.

Der besondere Vorteil einer Echtzeit-PCR liegt darin, dass der PCR-Verlauf schon während des Laufs, also in Echtzeit, verfolgt werden kann. Die Menge des im PCR-Ansatz vorhandenen Amplifikats wird nach jedem Zyklus gemessen. Dies wird ermöglicht durch die Verwendung eines Farbstoffs. Typischerweise handelt es sich hierbei um einen Fluoreszenz-Farbstoff (Fluorochrom). Meist findet die Messung der Fluoreszenz-Intensität nach der Elongationsphase jedes PCR-Zyklus statt. Da die Stärke des Fluoreszenz-Signals proportional zu der DNA-Menge im PCR-Ansatz ist, lassen sich Rückschlüsse auf den Verlauf der PCR und die verschiedenen PCR-Phasen ziehen. Bei einer quantitativen Echtzeit-PCR findet rechnerisch eine Quantifizierung der eingesetzten Matrizen-Menge des Zielgens im Vergleich zu einem Haushaltsgen statt. Dies ist auch der indirekte Rückschluss auf die Expressionsstärke des untersuchten Gens zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion; je stärker das Gen exprimiert wurde, desto mehr mRNA dieses Gens konnte extrahiert werden und desto mehr cDNA wurde synthetisiert. Hierbei lässt sich noch unterscheiden, ob es sich um eine absolute oder relative Quantifizierung handelt. Für eine absolute Quantifizierung muss die konkrete Ausgangsmenge, also z.B. die Kopienzahl, der RNA bzw. cDNA des zu untersuchenden Gens bekannt sein. Bei der relativen Quantifizierung wird die Expressionsstärke relativ zu einem konstant exprimierten Gen angegeben. Dies geschieht durch Verhältnisbildung. So auch in dieser Arbeit.

3.3.5.6 Der LightCycler®

Bei dem LightCycler handelt es sich um ein Gerät, das von der Firma Roche entwickelt wurde. Es ist für die Durchführung von Echtzeit-PCRs konzipiert. Nachfolgend soll zunächst

das Funktionsprinzip dieses Geräts erläutert werden, und im Anschluss der konkrete Einsatz in dieser Arbeit dargelegt werden.

Das Funktionsprinzip des LightCyclers®

Bei dem LightCycler® (Abb. 20 A) handelt es sich um ein Gerät, bei dem eine PCR-Cycler-Komponente mit einem Fluorimeter kombiniert wurde (Abb. 20 C). Dieses Prinzip wurde bereits 1997 veröffentlicht (Wittwer et al. 1997). Beide Komponenten werden im Anschluss erklärt.

Das LightCycler®-Gerät wird von der Firma Roche vertrieben und ermöglicht die Durchführung einer quantitativen Echtzeit-PCR. Die Verwendung von Glaskapillaren (Abb. 20 B) als Reaktionsgefäß und Luft als umgebendes Medium ermöglicht sehr schnelle Temperaturwechsel und damit auch einen besonders schnellen Ablauf von PCRs. Eine Verbindung der Fluorimeter-Einheit mit dem Computerprogramm „LightCycler® Software“ (Version 3.5) erlaubt eine sofortige Ansicht und direkte Verarbeitung der Daten.

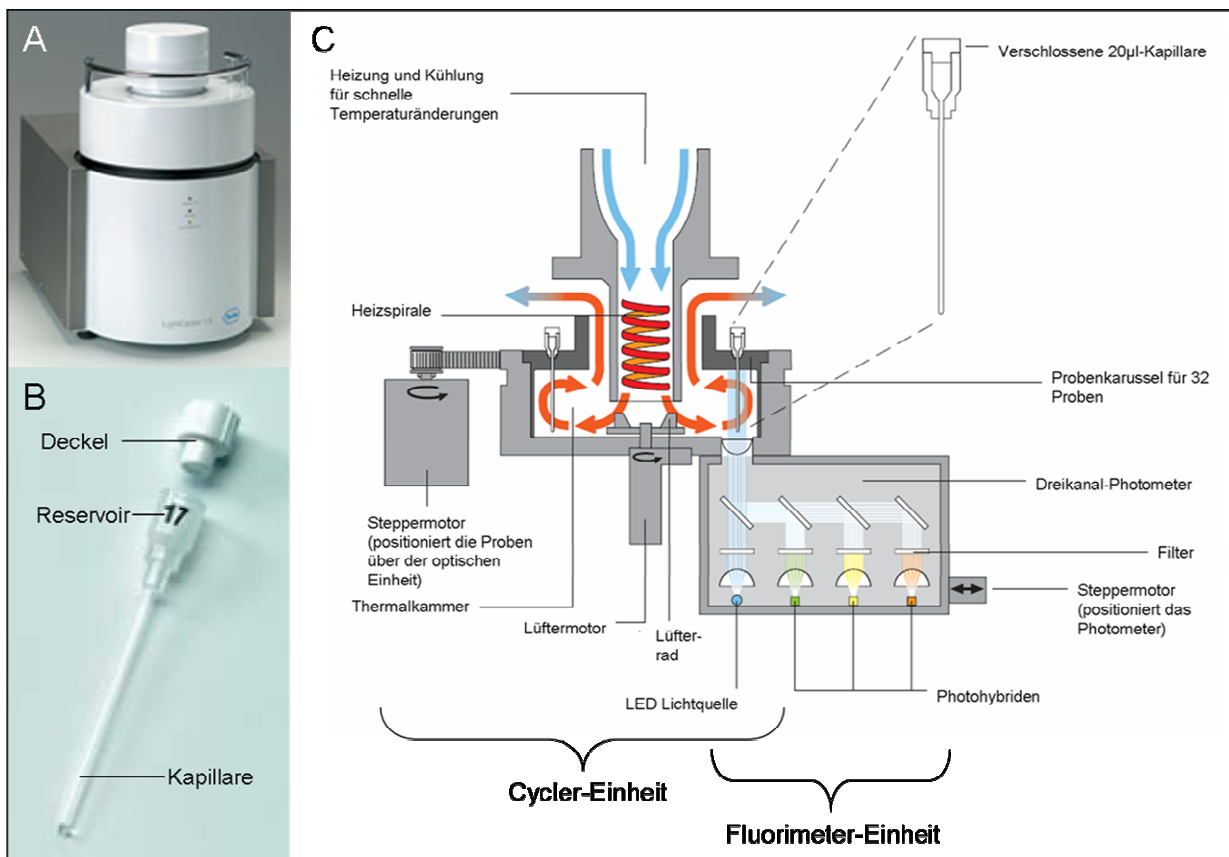


Abb. 20: Der LightCycler. A) Außenansicht des Geräts. B) Glaskapillare, in der die PCR-Reaktion stattfindet. Der untere Teil der Kapillare ist aus Borosilicat gefertigt. Der darüberliegende Reservoir-Teil besteht aus Kunststoff. In ihn werden die PCR-Komponenten pipettiert, und dann herunterzentrifugiert. Der Deckel ist ebenfalls aus Kunststoff gefertigt und dient dem Verschließen des Ansatzes. C) Schematischer Längsschnitt durch den LightCycler (Verändert nach Roche LightCycler® 1.5 Instrument - Operators Manual)

Anders als bei einem Blockcycler, bei dem die Quantifizierung der amplifizierten DNA erst als Endpunkt-Messung möglich ist, erlaubt dieser Aufbau, den Fortgang einer PCR kontinuierlich zu verfolgen. Dies geschieht dadurch, dass die amplifizierte DNA durch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert wird und, typischerweise nach jeder Elongationsphase, die Fluoreszenz gemessen wird. Dadurch, dass die Stärke des Fluoreszenz-Signals proportional zu der Menge des PCR-Produktes ist, lassen sich Rückschlüsse darauf ziehen, wieviel PCR-Produkt in welchem Zyklus synthetisiert wurde, in welchem Zyklus die Reaktion in die exponentielle Phase der PCR eintrat, wann die Plateauphase erreicht wurde, usw. Der Crossingpoint (C_p) ist der Zeitpunkt, zu dem das spezifische Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert (Threshold) überschreitet, und damit aus dem Hintergrund tritt. Er wird automatisch von der LightCycler[®]-Software ermittelt. Der PCR-Zyklus, in dem der C_p erreicht wird, ist der Threshold-Cycle (C_t). Alle Daten werden grafisch dargestellt und können bereits während des Laufes angesehen werden. Zusätzlich werden sie im Anschluss an die Messung gespeichert. Hierdurch ist es beispielsweise möglich, eine Standardkurve zu erstellen (Kapitel 3.3.5.8) und die PCR-Effizienz (Kapitel 3.3.5.8) zu berechnen, sowie das Verhältnis von Zielgenen zu Haushaltsgenen (Kapitel 3.3.5.10) zu ermitteln.

Für eine quantitative Echtzeit-PCR im LightCycler[®] werden die PCR-Reagenzien in Glaskapillaren (Abb. 20 B) pipettiert. Eine Kapillare besteht aus dem unteren Glaskapillaren-Teil, einem Reservoir aus Kunststoff und einem Deckel. Der Kapillaren-Teil ist aus Borosilicatglas gefertigt. Dieses Material ist besonders gut für Fluoreszenzmessungen geeignet. Die Kapillare hat eine Länge von 35 mm und einen äußeren Durchmesser von 1,55 mm. Die Kapillare ist dadurch so konzipiert, dass eine relativ große Oberfläche im Verhältnis zu einem kleinen Volumen steht. Dies ermöglicht eine schnelle Temperaturveränderung innerhalb des Ansatzes.

Die Funktionsweise von Cycler- bzw. Fluorimeteereinheit, sowie das verwendete Detektionsformat sollen im Folgenden erläutert werden.

Die Cycler-Einheit

Die Cycler-Einheit eines LightCyclers[®] lässt sich grob unterteilen in die Thermalkammer und das Probenkarussell (Abb. 20 C). Das Probenkarussell kann bis zu 32 Borosilicat-Kapillaren aufnehmen und wird nach dem Beladen in die zylindrische Thermalkammer eingesetzt. In der Mitte der Kammer befindet sich eine Heizspirale, mit deren Hilfe die Raumluft im Gerät erwärmt werden kann. Mit Hilfe eines im unteren Bereich des Geräts angebrachten Ventilators kann die erwärmte Luft gleichmäßig und effizient in der gesamten Kammer verteilt werden. Im Gegensatz zu herkömmlichen Block-Cyclern, bei denen Metall als Temperaturmedium dient, wird hier also Raumluft verwendet. Zwischen den drei Schritten eines PCR-Zyklus (Denaturierung, Anlagerung und Elongation) werden innerhalb

kürzester Zeit Temperaturunterschiede von bis zu 45°C benötigt. Luft lässt sich aufgrund ihrer wesentlich geringeren Masse wesentlich schneller erwärmen und auch wieder abkühlen als Metall. Im LightCycler-Gerät werden Temperaturveränderungen von bis zu 20°C pro Sekunde bei einer Temperaturgenauigkeit von $\pm 0,3^\circ\text{C}$ erreicht. Ein Temperatursensor befindet sich ebenfalls in der Thermalkammer, in der Nähe der Proben. Die schnellen Temperaturveränderungen führen zu einer erheblichen Zeitersparnis. Zusätzlich ist die Form der Glaskapillaren so gewählt, dass das Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis eine schnelle Temperaturveränderung auch innerhalb des PCR-Ansatzes ermöglicht. Das Ansatz-Volumen in einer Kapillare kann zwischen 10 μl und 20 μl liegen.

Die Thermalkammer ist direkt mit dem optischen System der Fluorimeter-Einheit verbunden. Diese wird im folgenden Teil erläutert.

Die Fluorimeter-Einheit

Bei der Fluorimeter-Einheit eines LightCyclers (Abb. 20 C) handelt es sich um ein Dreikanal-Photometer. Es erlaubt es, Fluoreszenzen bei Wellenlängen von 530 nm (Kanal 1), 640 nm (Kanal 2) und 710 nm (Kanal 3) zu messen. Der Messkanal ist danach auszuwählen, welcher Farbstoff verwendet wird. Das System erlaubt die Durchführung von Multiplex-PCRs. Hierfür müssen lediglich Fluorophore verwendet werden, die in unterschiedlichen Kanälen gemessen werden. Die Borosilicat-Kapillaren dienen gleichzeitig als Küvetten für die Fluoreszenzmessungen. Mit Hilfe eines Stepermotors wird hierfür jeweils eine Kapillare direkt über der optischen Einheit des Fluorimeters positioniert. Das von der Light Emitting Diode (LED) emittierte blaue Licht wird gefiltert und erhält so eine monochromatische Wellenlänge von $\lambda = 470 \text{ nm}$. Das Licht wird auf die Spitze der Kapillare fokussiert. Durch dieses kurzwellige Licht werden die Fluorophore angeregt und strahlen fluoreszentes Licht mit einer höheren Wellenlänge ab. Das abgestrahlte Licht wird zurück zur optischen Einheit geleitet, wo es durch ein Set aus Filtern und Spiegeln in unterschiedliche Wellenlängen aufgeteilt wird und in einem der drei Kanäle detektiert werden kann.

Detektionsformate im LightCycler

Grundsätzlich können im LightCycler zwei verschiedene Detektionsformate angewendet werden. Einerseits DNA-interkalierende Farbstoffe wie das SYBER[®] Green I, andererseits sequenzspezifische Sonden.

Interkalierende Farbstoffe fluoreszieren nur dann, wenn sie an die kleine Furche von doppelsträngiger DNA gebunden sind. Sie haben den Vorteil, dass sie universell einsetzbar, weil sequenzunspezifisch, sind. Außerdem ist die Signalstärke hoch, weil alle DNA-Moleküle Farbstoffmoleküle binden, und Schmelzkurven-Analysen sind möglich. Ein Nachteil besteht jedoch darin, dass nicht unterschieden werden kann, ob die vom Farbstoff abgestrahlte

Fluoreszenz deshalb emittiert wird, weil die Farbstoff-Moleküle mit der doppelsträngigen DNA des gewünschten Amplikons interkalieren, oder ob sie sich beispielsweise an Primer-Dimeren oder unspezifischen PCR-Produkten anlagern (Roche Universal ProbeLibrary Probes 1-165 Version Juni 2005).

Dies ist bei sequenzspezifischen Sonden anders. Hier werden sequenzspezifische Sonden entworfen, die mit einem Farbstoff, z.B. einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom), markiert sind. Wenn ein Fluoreszenzfarbstoff mit kurzwelligem Licht definierter Wellenlänge angestrahlt wird, gibt er Licht einer anderen, definierten und höheren, Wellenlänge ab. Die Intensität dieses Lichts wird gemessen. Sequenzspezifische Sonden lagern sich komplementär an eine bestimmte Basenabfolge an, und können über den Farbstoff detektiert werden. Hydrolyse-Sonden (Abb. 21) wie „TaqMan[®]“-Sonden (Livak et al. 1995) oder „Molecular Beacons“ (Tyagi und Kramer 1996) sind Beispiele hierfür. Bei diesen Sonden ist am 5'-Ende der Sonde ein fluoreszierender Reporter-Farbstoff angebracht, am 3'-Ende der Sonde ein Quencher-Molekül. Bei beiden Molekülen handelt es sich um Fluorochrome. Ihre Anregungs- bzw. Emissions-Wellenlängen sind so miteinander kombiniert, dass das vom Reporter emittierte Licht von dem Quencher aufgenommen wird, und nicht abgegeben wird. Dadurch kann die vom Reporter emittierte Fluoreszenz nicht gemessen werden. Dieses Prinzip funktioniert unter der Voraussetzung, dass beide Moleküle sich in räumlicher Nähe zueinander befinden.

Wenn sich die Sonde an einen DNA-Strang angelagert hat, und die Taq-Polymerase während einer PCR einen komplementären Strang synthetisiert, zerschneidet sie die angelagerte Sonde durch ihre 5' → 3' Exonuclease-Aktivität (Holland et al. 1991). Hierdurch entfernen sich Reporter und Quencher voneinander, und das Fluoreszenzsignal kann gemessen werden (Roche: Universal ProbeLibrary Probes 1-165 Version Juni 2005). Der Vorteil dieser Sonden liegt in ihrer hohen Spezifität. Fluoreszenz wird nur emittiert, wenn das richtige Amplikon hergestellt wird (Mauritz 2005).

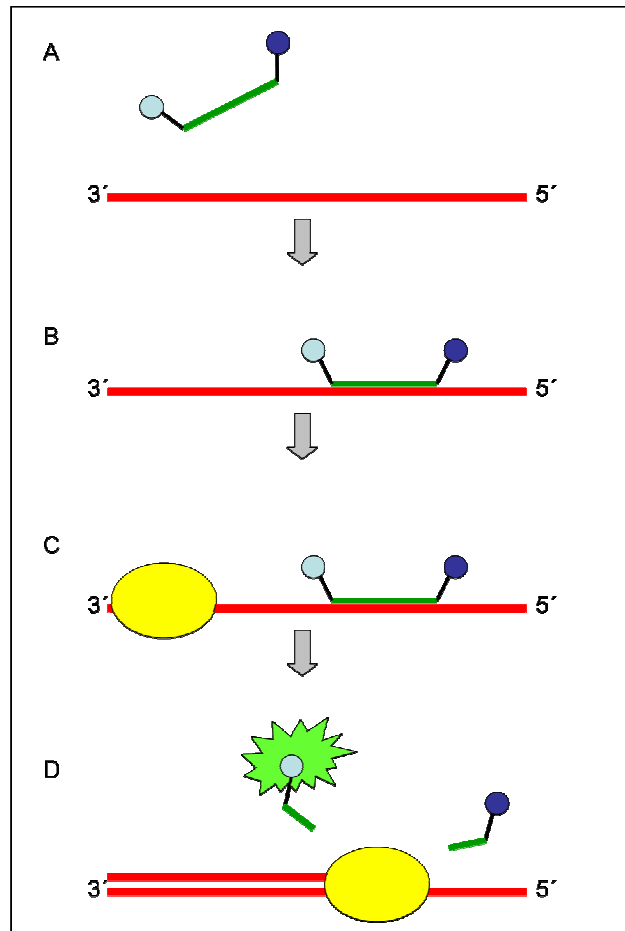


Abb. 21: Funktionsprinzip von Hydrolysesonden. A) Die Hydrolyse-Sonde (grün) ist an ihrem 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Molekül (hellblau) versehen, an ihrem 3'-Ende befindet sich ein Quencher-Molekül (dunkelblau). Es ist keine Fluoreszenz messbar. B) Die Sonde lagert sich komplementär an einen DNA-Strang (rot) an. C) Das Enzym Taq-Polymerase (gelb) lagert sich ebenfalls an dem DNA-Strang an und beginnt mit der Synthese eines komplementären DNA-Stranges. D) Wenn das Enzym an der Sonde anlangt, zerschneidet es diese durch ihre 5' → 3' Exonuclease-Aktivität. Durch die räumliche Trennung von Reporter und Quencher wird Fluoreszenz emittiert, sobald das Reporter-Molekül durch kurzwelliges Licht angeregt wird.

Das Universal-Probe-Library (UPL)-Sondensystem

Für diese Arbeit wurde als Detektionsformat das UPL-Sondensystem verwendet. Hierbei handelt es sich um ein System, das von der dänischen Firma Exiqon entwickelt wurde (Mauritz 2005) und von der Firma Roche vertrieben wird. Das System verspricht, die leichte Handhabung und breite Anwendbarkeit von SYBR[®] Green I mit der hohen Spezifität von Hydrolyse-Sonden miteinander zu kombinieren. Es basiert auf der Annahme, dass bestimmte Basenabfolgen in der DNA wesentlich häufiger vorkommen, als andere, und dass man mit 165 verschiedenen Sonden, die jeweils acht bis neun Nucleotide lang sind, (URL [5]), nahezu alle Transkripte der folgenden zehn Organismen detektieren kann: *Homo sapiens*, *Mus Musculus*, *Rattus norvegicus*, *Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*, *Pan troglodytes*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Saccharomyces cerevisiae* (Roche Universal ProbeLibrary Probes 1-165 Version Juni 2005,

URL [6]). Dadurch, dass die Sonden so kurz sind, kann man dieselbe Sonde für verschiedene Transkripte einsetzen (Mauritz 2005). Dies bedeutet eine hohe Flexibilität und breite Anwendbarkeit der Sonden. Speziell für das Genom des Menschen gibt es ein Set, das 90 der insgesamt 165 Sonden enthält, und mit dem man 98% der etwa 37.000 momentan bekannten menschlichen Gen-Transkripte detektieren können soll (URL [7]). Durchschnittlich enthält jedes menschliche Transkript Bindestellen für 16 verschiedene UPL-Sonden (Mauritz 2005). Bei den Sonden handelt es sich um Hydrolyse-Sonden nach dem TaqMan[®]-Prinzip (s.o), die am 5'-Ende mit dem Reporter-Fluorophor Fluorescein (FAM) markiert sind, und am 3'-Ende mit einem Quencher-Molekül. Dadurch, dass es sich bei den Sonden um Oktamere bzw. Nonamere handelt, wäre ihre Schmelztemperatur sehr niedrig. Um zu verhindern, dass die Sonden bei den hohen Temperaturen, die teilweise während einer PCR erreicht werden, Schaden nehmen, bestehen die UPL-Sonden teilweise aus „Festgesetzten Nucleinsäuren“ (Locked Nucleic Acids, LNA). Hierbei handelt es sich um DNA-Nucleotid-Analoga (Petersen und Wengel 2003), die eine höhere Bindungsaffinität zum Template-Strang haben als Standard-Nucleotide (Mauritz 2005, URL [8]). Die erhöhte Bindungsstärke wird hierbei dadurch erreicht, dass der Ribose-Ring des Moleküls durch eine Methylen-Brücke, die das 2'Sauerstoff-Atom mit dem 4'-Kohlenstoff-Atom verbindet, festgesetzt ist (Abb. 22). Durch diese chemische Modifikation steigt die Bindungsaffinität und die Schmelztemperatur ist erhöht. Für jede der Basen, die in RNA oder DNA vorkommen, gibt es ein LNA-Äquivalent.

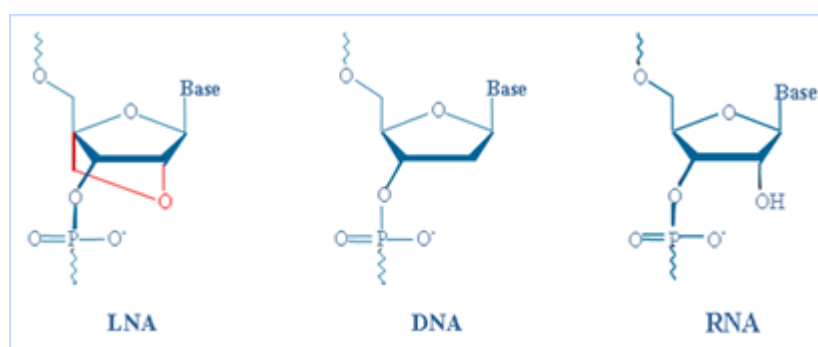


Abb. 22: Vergleich der Strukturformeln von LNA, DNA und RNA (Quelle: URL [8])

Die Sequenzen der verschiedenen Sonden werden nicht bekannt gegeben. Damit es dem Nutzer möglich ist, die am besten geeignete Sonde zu finden, bietet die Firma Roche die kostenlose Nutzung des unter online geschalteten „Assay Design Centers“ an (URL [9]). Auf dieser Internetseite gibt der Nutzer zunächst an, aus welchem Organismus die Sequenz stammt, für die er ein Assay entwerfen möchte. Danach hat er die Möglichkeit, entweder direkt die Sequenz einzugeben, mit der er arbeiten möchte, oder aber den Namen der Sequenz bzw. die Sequenz-ID oder ein Schlüsselwort einzugeben. Durch eine Verbindung

mit der RefSeq Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) sucht das Programm daraufhin sämtliche Sequenzen, auf die die angegebene Information passt. Hierbei werden die Sequenz-Identifikations-Nummer (ID), unter der die Sequenz bei NCBI gelistet ist, die Sequenzlänge und eine kurze Beschreibung angezeigt. Die Beschreibung gibt beispielsweise an, ob es sich um eine RNA- oder DNA-Sequenz handelt, ob eine Teilsequenz vorliegt etc. Anhand der Liste trifft der Nutzer eine Auswahl, für welche Sequenz das Programm ein Assay erstellen soll.

Die „ProbeFinder“-Software erstellt nun in drei Schritten ein Assay. Zuerst wird die Lage von Introns ermittelt. Dies geschieht entweder durch eine Suche in den Sequenzen des bioinformatischen Forschungsprojektes „ENSEMBL“, oder mit Hilfe des Programms „ProbeFinder intron predictor“. Im zweiten Schritt werden anhand dieser Informationen intronüberspannende (intron spanning) Primersequenzen erstellt. Es wird versucht, die Primer so zu entwerfen, dass sie nicht nochmals an einer anderen Stelle im Genom binden können (Roche: Universal ProbeLibrary Probes 1-165 Version Juni 2005). Die Primer sind der Grund für die hohe Spezifität des UPL-Assays. Dadurch, dass sie intronüberspannend sind, wird gewährleistet, dass die Primer nicht an genomische DNA (gDNA) binden. Bei der Extraktion von RNA ist häufig noch gDNA im Eluat vorhanden. Dies kann in einer PCR zu Artefaktbildung führen. Diese Fehlerquelle wird durch den Einsatz der intronüberspannenden Primer minimiert. Im dritten Schritt erfolgt die Auswahl einer UPL- Sonde, die innerhalb der durch die Primer festgelegten Amplikonsequenz bindet (Roche: Universal ProbeLibrary Probes 1-165 Version Juni 2005). Außerdem sind die Amplikons meist kürzer als 100 bp.

Der Nutzer kann sich das entstandene Assay im .pdf-Format auf seinen Computer herunterladen. Neben weiteren Informationen werden die Primersequenzen, die zu verwendende Sonde und die Sequenz des zu erwartenden Amplifikate angegeben. Weiterhin ist schematisch dargestellt, wo auf der verwendeten Sequenz die angegebene Sonde binden wird (Abb. 23).

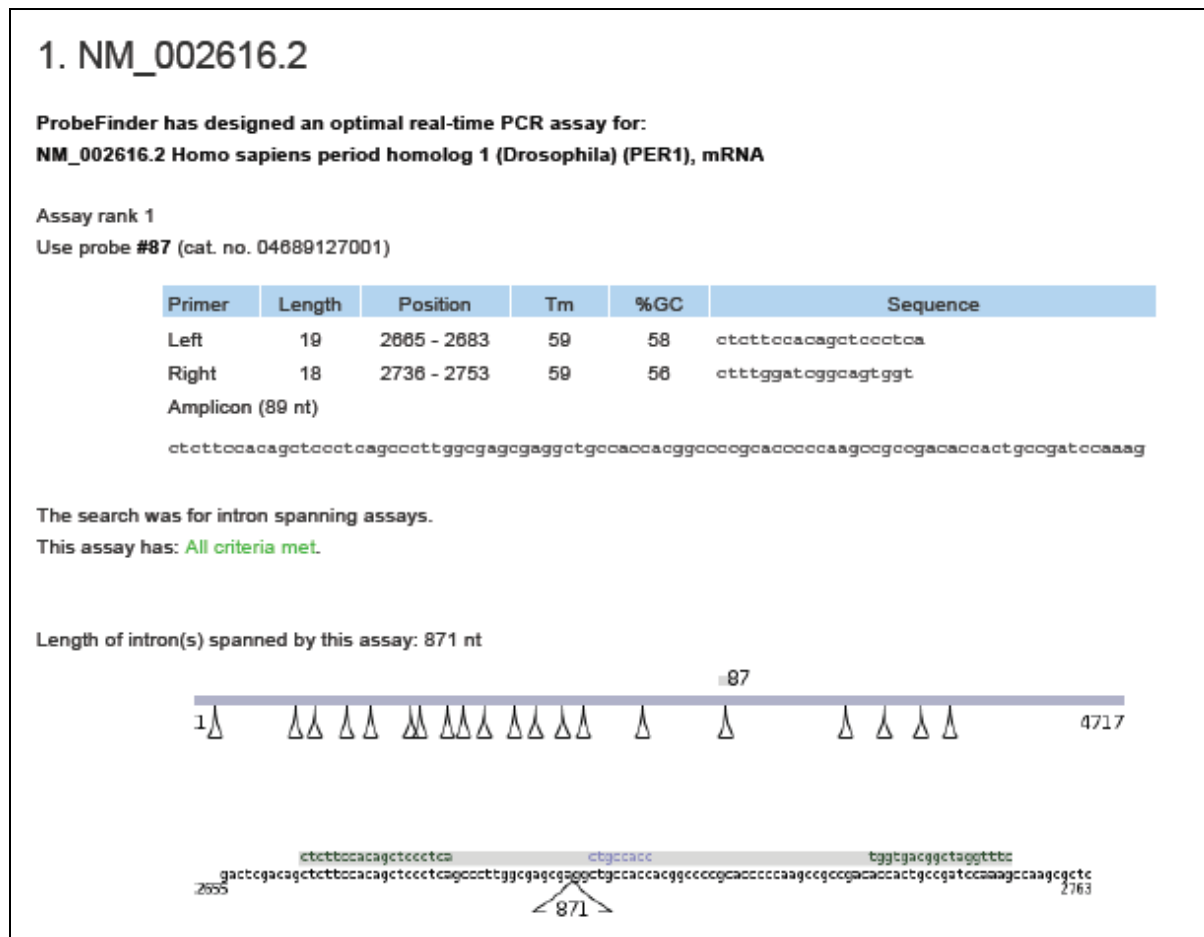


Abb. 23: Teil eines UPL-Sonden-Assays mit Angabe der zu verwendenden Sonde sowie Informationen zu Primersequenzen und dem entstehenden Amplikon

3.3.5.7 Etablierung von quantitativer Echtzeit-RT-PCR mit LightCycler® und UPL SONDENSYSTEM

Zur Etablierung der quantitativen Echtzeit-RT-PCR am LightCycler® wurden zunächst für alle Gene, die untersucht werden sollten, Assays entworfen, wie unter Punkt 3.3.5.6 angegeben. Die von dem Programm ausgegebenen Primer-Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms „OligoAnalyzer“, das im Internet frei verfügbar ist, (URL [10]) darauf getestet, wie hoch die Wahrscheinlichkeit war, dass sie Dimere bilden. Wenn die Wahrscheinlichkeit gering war, wurde die Synthese der Primer in Auftrag gegeben. Es schloss sich eine Gradienten-PCR auf einem Blockcycler an. Während dieser wurden mehrere Anlagerungs-Temperaturen getestet. Mittels eines zweiprozentigen Agarose-Gels und eines „Low Range“-Standards wurde im Anschluss überprüft, ob das Amplikon die erwartete Länge aufwies, eine einzelne Bande vorhanden war und bei welcher Temperatur diese zu erwarten war. Weiterhin wurde darauf geachtet, ob es Hinweise auf Primerdimere gab. Wenn die PCR mit der ausgewählten Anlagerungstemperatur auf dem Blockcycler erfolgreich reproduziert werden konnte, erfolgte daraufhin eine PCR auf dem LightCycler®. Bei allen PCRs, die auf dem LightCycler® durchgeführt wurden, handelte es sich um Heißstart-PCRs. Im Anhang finden sich

Genarbeitsblätter mit allen Angaben, die zur Reproduktion der in dieser Arbeit durchgeführten PCRs nötig sind (A9: Genarbeitsblatt *hBMAL1*, A10: Genarbeitsblatt *hPER1*, A11: Genarbeitsblatt *h36B4*, A12: Genarbeitsblatt *hGAPDH*, A13: Genarbeitsblatt *hHPRT*).

Bis auf die Oligonukleotide stammten sämtliche Reagenzien, die für den Ansatz einer LightCycler-PCR nötig waren, aus dem „LightCycler TaqMan Master“-Kit der Firma Roche. Im Anschluss soll erklärt werden, wie ein solcher Ansatz zusammengestellt wurde. Für einen einzelnen 20 µl-Ansatz wird jeweils ein Mikroliter von Vorwärts- und Rückwärts-Primer mit 0,2 Mikrolitern der Sonde vermischt, die laut erstelltem Assay (Abb. 23) zu verwenden war. Zu diesem Primer-Sonden-Mix wurden 8,8 µl H₂O für PCR und vier Mikroliter des sogenannten „Mastermix“ gegeben. Letzterer beinhaltet Puffer und eine Heißstart-Polymerase. Während jedes Laufs wurde neben den Proben der Probanden eine Wasserkontrolle als Negativprobe mitgeführt. Als Positivkontrolle diente die cDNA, mit deren Hilfe die Standardkurven erstellt wurden (3.3.5.8). Sämtliche Ansätze wurden in Duplikat durchgeführt. Vor dem Befüllen der Borosilicat-Kapillaren wurde also zunächst errechnet, in wievielen Ansätzen gleichzeitig eine PCR ablaufen sollte. Es wurde ein Ansatz für alle PCRs gleichzeitig angesetzt, der im Folgenden „Master-Mastermix“ genannt werden soll, da als „Mastermix“ bereits ein Bestandteil des LightCycler TaqMan Master-Kits benannt wurde. Von diesem Master-Master-Mix wurden jeweils 15 µl in das Reservoir im oberen Teil der Kapillare (Abb. 20 B) pipettiert. Hinzugegeben wurden fünf Mikroliter der jeweiligen Matrize. Die Kapillaren wurden verschlossen, und die Ansätze 30 Sekunden lang bei 3000 Umdrehungen pro Minute in einer Standard-Tischzentrifuge zentrifugiert. Dieses Protokoll gilt für alle während dieser Studie durchgeführten PCRs auf dem LightCycler. Im Anschluss wurden die Kapillaren in das LightCycler-Probankarussel eingesetzt, und der Lauf gestartet.

Die Programmierung des Geräts hatte bereits im Vorfeld stattgefunden. Eine Beschreibung des Programms erfolgt im anschließenden Abschnitt.

Programmierung des LightCyclers

Die Programmierung des LightCyclers[®] erfolgte wie in der „LightCycler[®] Software 3.5 Kurzanleitung“ der Firma Roche angegeben. Alle PCRs, aus denen Ergebnisse in diese Arbeit einfließen, wurden mit dem nachfolgend schematisch dargestellten Programm durchgeführt. Der einzige Unterschied zwischen den verschiedenen Läufen bestand in der Höhe der Anlagerungstemperaturen. Diese finden wurden bereits in der Tabelle 8 aufgeführt. Bei den nachfolgend in der Tabelle 9 verwendeten Begriffen handelt es sich um englische Begriffe, da diese auch vom Programm verwendet werden.

Tab. 9: Übersicht über ein PCR-Programm, wie es auf dem LightCycler Anwendung findet

Cycles	Analysis Mode	Target Temperature (°C)	Incubation time (min:sec.)
Denaturierung:			
1	none	95	10:00
Amplifikation :			
45	Quantification	95	00:10
		Primerabhängige Anlagerungs- Temperatur	00:20
		72	00:10
Cooling :			
1	none	20	

Wie alle PCR-Programme, die auf einem LightCycler durchgeführt werden, zeichnet sich auch dieses Programm dadurch aus, dass alle eingestellten Zeiten sehr kurz sind. Auf diesen Vorteil, der durch die Verwendung von Luft als Temperatur-Medium erreicht wird, wurde bereits hingewiesen. Das Programm begann mit einem initialen Denaturierungsschritt. Während diesem wurde zehn Minuten lang eine Temperatur von 95°C gehalten. Dies hatte den Hintergrund, dass in dem verwendeten LightCycler TaqMan Master-Kit eine Heißstart-Polymerase enthalten ist. An diese ist ein Antikörper gebunden, der sich erst durch das Erhitzen des Ansatzes von dem Enzym löst. Hierdurch wird gewährleistet, dass die Polymerase nicht bereits vor Erreichen ihrer spezifischen „Arbeitstemperatur“ von 72°C an die DNA bindet und unspezifische Produkte entstehen. Während der hier „Amplifikation“ genannten Phase fand die Wiederholung der drei PCR-Phasen Denaturierung, Anlagerung und Elongation statt. Es wurden 45 Zyklen durchgeführt. Diese relativ hohe Zyklenzahl wurde gewählt, um zu gewährleisten, dass die PCR auf jeden Fall die Plateauphase erreicht. Nach jedem Elongationsschritt wurde die Stärke des Fluoreszenzsignals gemessen. Die hier „Cooling“ genannte Phase diente dazu, die Temperatur innerhalb der Thermalkammer wieder auf die Umgebungswerte zu bringen.

3.3.5.8 Erstellen von Standardkurven und Coefficient Files, Berechnung von Gen-Ratios

Im Rahmen dieser Arbeit wurden quantitative Echtzeit-RT-PCRs mit anschließender Effizienzkorrektur durchgeführt. Nach der Etablierung der PCRs wurden zunächst für jedes Zielgen und jedes Haushaltsgen Standardkurven erstellt. Dies geschieht mit Hilfe der LightCycler Software. Hierfür ist folgendes Vorgehen nötig:

1. Erstellen von Standardkurven mit Hilfe der LightCycler® Software

Zur Erstellung einer Standardkurve wurde zunächst ein Calibrator hergestellt. Dies ist eine größere Menge desselben Templates, in diesem Falle also cDNA. Von diesem Calibrator wurden verschiedene Verdünnungsstufen hergestellt. Es wurde eine PCR durchgeführt, bei der parallel zueinander Ansätze mit verschiedenen Calibrator-Verdünnungsstufen als Matrize dienten. Je höher die Verdünnungsstufe war, desto mehr Replikate dieser Verdünnungsstufe wurden verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Verdünnungsstufen sowie die Anzahl der eingesetzten Replikate sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tab. 10: Calibratorverdünnungsstufen und Anzahl der Replikate für die Erstellung von Standardkurven

Calibrator-Verdünnung	Anzahl Replikate
Unverdünnt	2
1:1	2
1:4	3
1:9	3
1:19	4
1:49	5

Zur Erstellung der Standardkurven wurden zunächst die Werte der Crossingpoints, also des Zeitpunkts, zu dem das Fluoreszenzsignal innerhalb eines Ansatzes aus dem Hintergrund hervortritt, von dem Programm LightCycler Software errechnet. Diese Werte wurden logarithmiert, und in einem Koordinatenkreuz eingetragen. Die Gerade, die durch die eingetragenen Werte führt, ist die Standardkurve (Abb. 24).

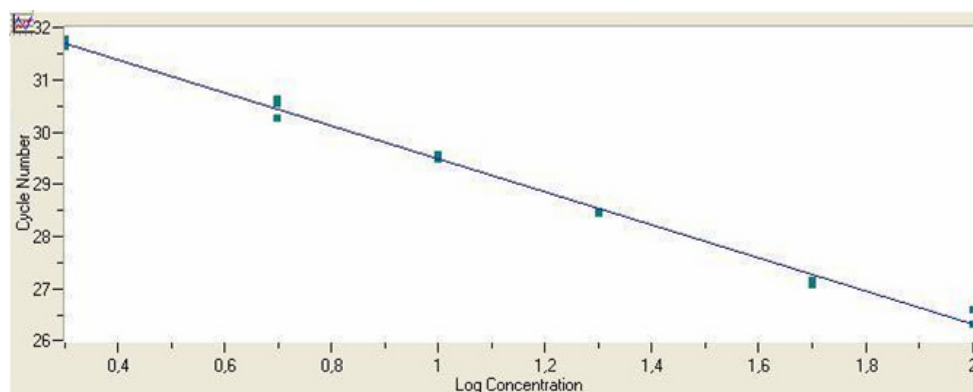


Abb. 24: Standardkurve einer LightCycler-PCR. Auf der Ordinate sind die PCR-Zykluszahlen aufgetragen, in denen die jeweiligen Crossingpoints erreicht wurden, auf der Abszisse die logarithmierten Werte der Crossingpoints.

Anhand der Steigung der Standardkurve, die ebenfalls von dem Programm LightCycler Software ermittelt wird, kann die PCR-Effizienz mit folgender Formel errechnet werden:

:

$$E = 10^{-1/\text{slope}}$$

Hierbei ist E die PCR-Effizienz und „slope“ bezeichnet die Steigung der zugehörigen Standardkurve. Die theoretische Effizienz einer PCR liegt bei $E = 2$. Dies ist der Fall, wenn die Amplikon-Menge während jedem PCR-Zyklus tatsächlich einmal verdoppelt wird. Das ist in der Realität aber häufig nicht der Fall. Oft ist die erreichte Effizienz kleiner als zwei. Dies ist für die Effizienzkorrektur wichtig. Geht man bei einer relativen Quantifizierung davon aus, dass Zielgen und Haushaltsgen die gleiche Effizienz haben, also in der Theorie zwei, die Effizienzen sich aber unterscheiden, kann es zu großen Abweichungen zwischen dem errechneten Verhältnis von Zielgen zu Haushaltsgen und dem tatsächlichen Verhältnis kommen. Hier setzt die Effizienzkorrektur an, die mit Hilfe des Programms RelQuant durchgeführt wird. Hier findet der zweite Schritt statt:

2. Erstellen von Coefficient-Files

In das Programm RelQuant werden die Standardkurven der beiden Gene eingeladen, mit denen die relative Quantifizierung durchgeführt werden soll. Es handelt sich also immer um ein Haushaltsgen und ein Zielgen. Das Programm errechnet anhand der Standardkurven die Effizienzen beider PCR-Läufe, vergleicht sie miteinander und erstellt ein sogenanntes Coefficient-File. Dieses beinhaltet die Informationen über die PCR-Effizienzen, die das Programm für die relative Quantifizierung braucht, um mögliche Unterschiede mathematisch auszugleichen. Für jede Haushaltsgen-Zielgen-Kombination wird nur einmal ein Coefficient-File erstellt, da man davon ausgeht, dass alle PCRs desselben Genabschnitts die gleiche Effizienz aufweisen. Wenn dies geschehen ist, kann der dritte Schritt erfolgen.

3. Berechnen der Expressionsverhältnisse von Zielgen und Haushaltsgen.

Nachdem man die Coefficient-Files erstellt hat, werden die PCRs der Proben durchgeführt, für die man eine relative Quantifizierung durchführen will. Es werden jeweils eine PCR für das Haushaltsgen und eine für das Zielgen mit derselben Ausgangs-Matrize, in dieser Arbeit also cDNA der verschiedenen Probanden, durchgeführt. Die Ergebnisse der beiden PCR-Läufe werden danach zusammen mit dem zugehörigen Coefficient-File in das RelQuant-Programm eingeladen, und dieses erstellt die Ratios zwischen den Genen.

Bei einer relativen Quantifizierung wird von der Menge des Amplifikats zu einem bestimmten Zeitpunkt, dem Crossing point (s.o.), auf den Ausgangswert zurückgeschlossen.

Dies geschieht sowohl für das Haushaltsgen als auch das Zielgen. Die theoretischen Anfangsmengen werden zueinander ins Verhältnis gesetzt. Dieses Verhältnis ist die Ratio.

3.3.5.9 Auswahl eines Haushaltsgens

Aufgrund der dauerhaft unveränderten Expressionsstärke eines Haushaltsgens eignet es sich als Standard im Rahmen einer relativen Quantifizierung. Die Expressionsrate des regulierten Zielgens wird als relativ zu der Expressionsrate des Haushaltsgens angegeben. Um zuverlässige und genaue Ergebnisse zu bekommen, ist es also von großer Bedeutung, dass das Haushaltsgen tatsächlich nicht reguliert wird. Mehrere Studien konnten jedoch zeigen, dass verschiedene „klassische“ Haushaltsgene, von denen man vorher annahm, dass sie stets gleichmäßig exprimiert werden, unter bestimmten Bedingungen sehr wohl unterschiedlich stark exprimiert wurden (Schmittgen 2000, Vandesompele 2002). Deshalb sollte bei der Auswahl eines Haushaltsgens große Sorgfalt walten, und es ist zu überprüfen, ob ein potentielles Haushaltsgen unter den Bedingungen, die in einer Studie untersucht werden, einer Expressions-Regulierung unterliegt, oder nicht. Für diese Studie bedeutete dies, dass der Nachweis erbracht werden musste, dass die Expressionsrate mindestens eines der drei vorausgewählten Haushaltsgene *h36B4*, *hGAPdh* und *hHPRT* durch keins der drei Kriterien Alter, Geschlecht oder Schlafqualität beeinflusst wird. Weiterhin sollte ein Gen ausgewählt werden, das möglichst keine Pseudogene hat oder zu einer Genfamilie gehört, und die Expressionsstärke von Zielgen und Haushaltsgen sollte etwa gleich sein, um eine möglichst genaue relative Quantifizierung zu ermöglichen.

Zum Nachweis, dass mindestens ein Haushaltsgen nicht reguliert wird, wurden zunächst PCRs auf dem LightCycler für alle drei Haushaltsgene sowie ein Zielgen durchgeführt. In vorliegender Arbeit wurde das Zielgen *hPER1* dazu herangezogen. Wie vorher beschrieben, wurden die Ratios von Haushaltsgenen und dem Zielgen gebildet. Die Ratios wurden in ein Säulendiagramm eingetragen. Wenn mindestens zwei der Haushaltsgene unter verschiedenen Bedingungen untereinander die gleichen Ratio-Verhältnisse zeigen, so gilt es als erwiesen, dass sie unter den Studienbedingungen nicht reguliert werden. Somit können sie als Haushaltsgen eingesetzt werden. Zur Verdeutlichung dieser Aussage soll die Abbildung 25 dienen.

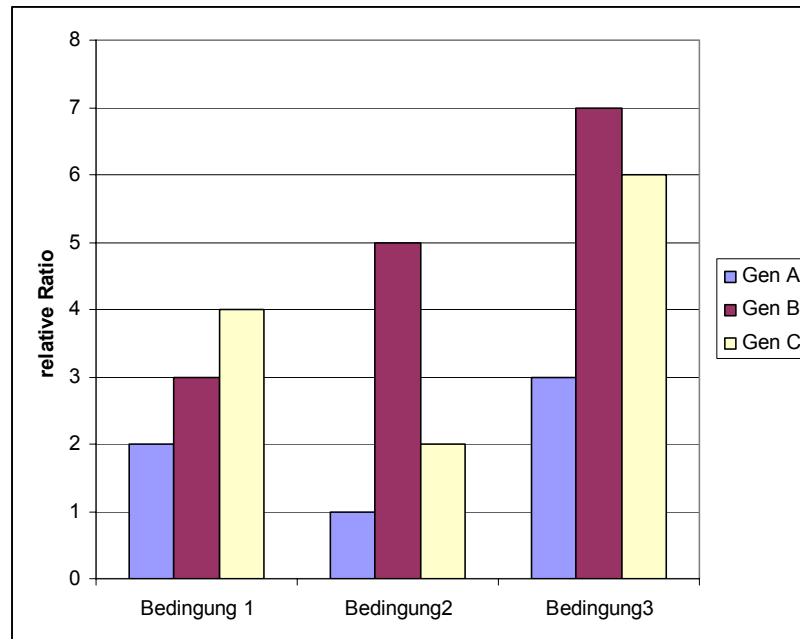


Abb. 25: Schematische Darstellung zum Nachweis, ob Haushaltsgene reguliert werden, oder nicht. Dargestellt sind die Ratios von drei Haushaltsgenen (A, B, C) zu einem Zielgen unter drei verschiedenen Bedingungen (1, 2, 3). Das Verhältnis der Ratios von Gen A und Gen C ist unter allen drei Bedingungen gleich. Die Ratio-Werte von Gen C sind jeweils doppelt so hoch wie die von Gen A. Diese beiden Gene wären somit als Haushaltsgene für eine Studie geeignet, in der die Bedingungen 1 und 2 untersucht werden sollen. Anders das Gen B. Seine Ratios stehen unter den drei Bedingungen in einem anderen Verhältnis zu den Genen A und C. Dieses Gen ist nicht als Haushaltsgen geeignet.

3.3.5.10 Relative Quantifizierung mit Hilfe des RelQuant-Programms

Mit der Erstellung von Standardkurven und von Coefficient-Files sind bereits wichtige Schritte durchgeführt worden, die nötig sind, um eine relative Quantifizierung durchführen zu können. Die eigentliche Erstellung der Ratios erfolgte während dieser Studie mit Hilfe des RelQuant-Programms. Hierzu wurden die Coefficient-Files sowie die Daten der LightCycler-Läufe von Ziel- und Haushaltsgen in das Programm eingeladen, welches dann die Berechnung der Ratios übernahm. Die Ratios geben den Expressionsverlauf der Zielgene wieder, und flossen in die statistische Auswertung mit ein.

3.3.6 Hormonanalysen

Anhand von Speichelproben wurden im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe von Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays (ELISAs) Konzentrationsbestimmungen der beiden Hormone Melatonin und Cortisol, deren Synthese einer circadianen Rhythmik unterliegt, durchgeführt. Für das Cortisol wurde für jeden Probanden ein Morgenprofil erstellt, für das Melatonin ein Abendprofil. Die Durchführung der ELISAs und die Berechnung davon abgeleiteter Werte soll im Folgenden erläutert werden.

3.3.6.1 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

Ein ELISA ist eine vielseitig anwendbare und sensitive Technik, die es ermöglicht, das Vorhandensein von Antigenen oder Antikörpern bereits in sehr geringen Mengen (Picogramm-Bereich) in Körperflüssigkeiten wie Blutserum oder Speichel nachzuweisen und ihre Konzentration zu bestimmen. Die Methode ist gut standardisierbar und weist eine hohe Reproduzierbarkeit auf.

Je nach Einsatz eines ELISAs können viele verschiedene Fragestellungen bearbeitet werden, die jeweils einen anderen Versuchsaufbau benötigen. Es ist deshalb nicht möglich, von „dem“ Prinzip eines ELISAs zu sprechen. Grundsätzlich werden jedoch immer mindestens folgende drei Schritte kombiniert:

- 1) Adsorption von Antikörper oder Antigen an eine Festphase (z.B. Plastikoberfläche einer 96 Well-Platte)
- 2) spezifische Interaktion von Antigen und Antikörper
- 3) enzymatische Nachweisreaktion (durch z.B. Farbreaktion)

Zwischen diesen Punkten können noch weitere Schritte, wie die Verwendung eines zweiten Antikörpers, der spezifisch an den ersten bindet, liegen. Hierdurch kann eine noch höhere Spezifität erreicht werden. Um die Enzymreaktion möglichst einfach nachweisen zu können, setzt man Enzyme ein, deren Substratreaktion zu einer Färbung führt. Die Intensität der Färbung lässt sich photometrisch messen und Rückschlüsse auf die Konzentration des Antigens sind möglich. Die am häufigsten benutzten Enzyme sind Meerrettich-Peroxidase (horse radish peroxidase, HRP) und Alkalische Phosphatase.

3.3.6.1.1 Cortisol-ELISA zur Konzentrationsbestimmung von Cortisol in Speichel

Wie in Kapitel 1.6.1 erwähnt wurde, liegt im Speichel nur die physiologisch aktive Form des Cortisols vor, wohingegen im Blut weit über 90% des vorhandenen Cortisols gebunden, und somit physiologisch inaktiv, sind. Um Aussagen über den Cortisol-Status eines Probanden machen zu können ist es deshalb meist sinnvoll, Speichel als Probenmaterial zu verwenden. In dieser Arbeit fand das „Cortisol ELISA“-Kit der Firma IBL International Anwendung, das es ermöglicht, Speichel als Probenmaterial zu verwenden. Der Test beruht auf dem Prinzip eines kompetitiven ELISAs, bei dem eine bekannte Menge enzymmarkierten Antigens aus dem Kit mit einer unbekanntem Menge Antigen aus der zu untersuchenden Probe um die Bindungsstellen eines Cortisol-Antikörpers konkurriert. Der Konzentrations-Nachweis erfolgt im Anschluss über eine Farbreaktion bzw. über eine Absorptionsmessung.

In dieser Studie wurden ausschließlich Speichelproben für die Hormonanalyse verwendet. Die Proben hierfür wurden wie in Kapitel 3.3.4 angegeben gesammelt. Gemessen wurde

Cortisolkonzentration der fünf Speichelproben, die die Probanden bei sich zuhause während der ersten Stunde nach dem Aufwachen gesammelt hatten. Die Proben wurden zunächst bei -20°C gelagert. Das Einfrieren der Speichelproben führt zu der Zerstörung von mucösen Bestandteilen, die dem Speichel seine Viskosität verleihen und das Pipettieren deutlich erschweren. Vor dem Auftragen der Proben auf die Mikrotiterplatte wurden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut, durchmischt und zehn Minuten lang bei 3000 g und 4°C zentrifugiert, um enthaltene Partikel zu sedimentieren. Durch eine Sichtkontrolle wurde sichergestellt, dass der Speichel nicht mit Blut kontaminiert war.

An den Boden der Mikrotiterplatten-Kavitäten sind Cortisol-Antikörper aus Kaninchen adsorbiert (s. Abb. 28 A). Von dem Überstand der Proben sowie von den Standards und Kontrollen wurden jeweils 50µl abgenommen und dem Pipettierschema entsprechend (Abb. 26) in die Kavitäten gegeben (Abb. 27 B). Auch hier werden englische Begriffe aus dem verwendeten Kit übernommen. Der Kalibrator mit der niedrigsten Konzentration heißt beispielsweise „CAL A“ usw. Alle Proben wurden in Duplikat untersucht. Sämtliche Proben eines Probanden wurden im selben Lauf gemessen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAL A	CAL A	Contr.2	Contr.2	Leer	Leer	Leer	Leer	Leer	Leer	Leer	Leer
B	CAL B	CAL B	Prob A S1	Prob A S1	Prob A S2	Prob A S2	Prob A S3	Prob A S3	Prob A S4	Prob A S4	Prob A S5	Prob A S5
C	CAL C	CAL C	Prob B S1	Prob B S1	Prob B S2	Prob B S2	Prob B S3	Prob B S3	Prob B S4	Prob B S4	Prob B S5	Prob B S5
D	CAL D	CAL D	Prob C S1	Prob C S1	Prob C S2	Prob C S2	Prob C S3	Prob C S3	Prob C S4	Prob C S4	Prob C S5	Prob C S5
E	CAL E	CAL E	Prob D S1	Prob D S1	Prob D S2	Prob D S2	Prob D S3	Prob D S3	Prob D S4	Prob D S4	Prob D S5	Prob D S5
F	CAL F	CAL F	Prob E S1	Prob E S1	Prob E S2	Prob E S2	Prob E S3	Prob E S3	Prob E S4	Prob E S4	Prob E S5	Prob E S5
G	CAL G	CAL G	Prob F S1	Prob F S1	Prob F S2	Prob F S2	Prob F S3	Prob F S3	Prob F S4	Prob F S4	Prob F S5	Prob F S5
H	Contr.1	Contr.1	Prob G S1	Prob G S1	Prob G S2	Prob G S2	Prob G S3	Prob G S3	Prob G S4	Prob G S4	Prob G S5	Prob G S5

Abb. 26: Pipettierschema eines Cortisol-ELISAs. CAL = Kalibrator; Contr = Kontrolle; Prob = Proband; S = Probennummer

Die leeren Kavitäten ergeben sich daraus, dass jeweils alle Proben eines Probanden zusammen und in Duplikat auf eine 96-Kavitätenplatte aufgetragen wurden. Somit waren pro Proband zehn Kavitäten nötig. Die Anzahl der Standards und Kalibratoren war durch das verwendete Kit vorgegeben. Die Konzentrationen von Standards und Kontrollen sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tab. 11: Konzentrationen der Cortisol-Standards und –Kontrollen aus dem Cortisol ELISA-Kit

Name	Konzentration (µg/dl)
CAL A	0,0
CAL B	0,03
CAL C	0,06
CAL D	0,20
CAL E	0,60
CAL F	1,50
CAL G	4,00
Control 1	0,094 – 0,196
Control 2	0,78 – 1,44

Im anschließenden Schritt wurden zu allen befüllten Kavitäten 100 µl Enzymkonjugat zugegeben. Dieses enthielt eine bekannte Menge chromatographisch gereinigtes Cortisol, welches mit einer Meerrettich-Peroxidase konjugiert war. Nun wurde die Platte mit einer Haftklebefolie abgedeckt und zwei Stunden lang bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler bei 500 U/min inkubiert. Die kompetitive Phase des ELISAs lag in dieser Zeit. Während der Inkubation binden sowohl das Cortisol aus der Speichelprobe als auch das an die HRP gebundene Cortisol an die Antikörper am Boden der Kavitäten. Je weniger Cortisol in der Probe des Probanden enthalten ist, desto mehr des Cortisol-Enzym-Komplexes kann an die Antikörper binden (Abb. 27 B). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Folie entfernt und die Inkubationslösung verworfen. Mit Hilfe einer 8-Kanal-Pipette wurden die Kavitäten viermal mit je 250 µl Waschpuffer pro Waschschrift und Kavität gewaschen (Abb. 27 C). Verbliebene Flüssigkeit wurde durch Ausklopfen der Platte auf Zellstoff entfernt. Anschließend wurde jede Kavität mit 100 µl Tetramethylbenzidin (TMB) Substratlösung befüllt. Auf einem Orbitalschüttler schloss sich eine 30minütige Inkubation bei 500 U/min und Raumtemperatur an (Abb. 27 D). Bei dem TMB handelt es sich um das Substrat der HRP. Während des Umsatzes des TMB durch die HRP färbt sich die Lösung blau. Die Färbung erlaubt später eine photometrische Messung und somit die Erstellung einer Standardkurve bzw. die Konzentrationsbestimmung in den Proben.

Durch Zugabe von 100µl TMB Stopplösung (Abb. 27 E). zu der Inkubationslösung und kurzes Schütteln der Platte wurde die Substratreaktion gestoppt. Bei der Stopplösung handelt es sich um einmolare Schwefelsäure (1M H₂SO₄). Diese inaktiviert die HRP. Durch die einhergehende Veränderung des pH-Werts Richtung sauer findet ein Farbumschlag von blau nach gelb statt.

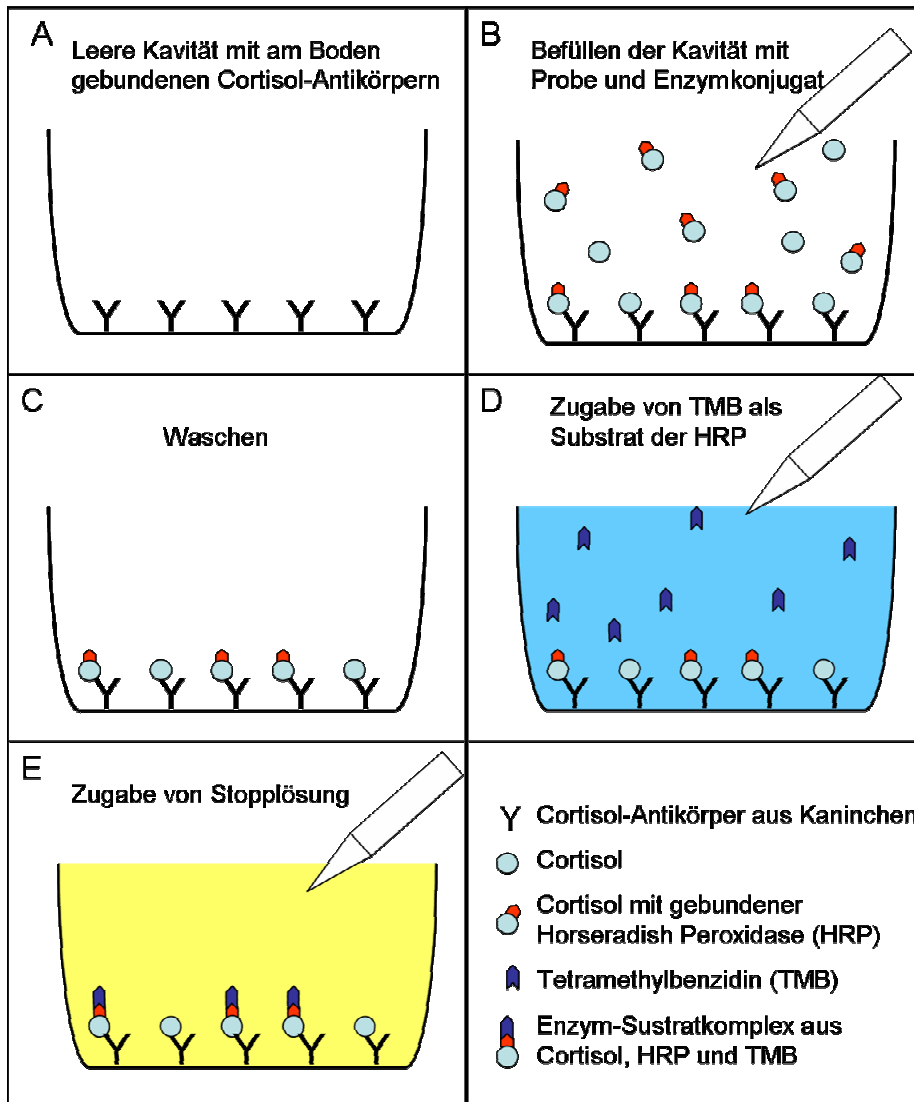


Abb. 27: Funktionsprinzip des verwendeten Cortisol-ELISAs

Die anschließende photometrische Messung fand innerhalb von 15 min. im Tecan Genios statt. Entsprechend der Angaben des Herstellers des ELISA-Kits wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450\text{nm}$ bestimmt, die Referenzwellenlänge lag bei $\lambda = 620\text{nm}$. Anhand der Absorptionwerte der Standards wurde mit Hilfe des Programms Magellan (Version 3.0) für jeden Lauf eine Standardkurve erstellt. Durch die semi-logarithmische Darstellung der Kurve (Abb. 28) wird eine sigmoidale Form der Kurve mit einer linearen Zwischenphase erreicht. Auf Grundlage dieser errechnete das Programm daraufhin die Hormon-Konzentrationen in den Kontrollen und in den Speichelproben der Probanden.

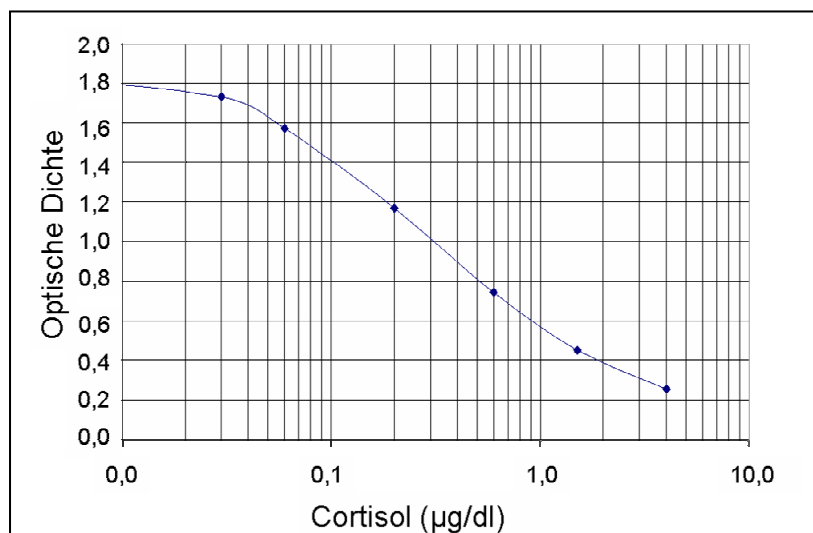


Abb. 28: Standardkurve eines Cortisol-ELISAs (verändert nach Bedienungsanleitung „Cortisol ELISA“ der Firma IBL)

Jede Platte wurde zweimal gemessen. Dies hatte den Grund, dass vom Kit-Hersteller verschiedene Formeln angegeben wurden, mit denen die Werte für die Standardkurve errechnet werden können. So wurde die Standardkurve nach der ersten Messung mit Hilfe der LogitLog-Methode aus den Werten der Standards erstellt, nach der zweiten Messung mit der 4 Parameter-Methode. Die jeweils erhaltenen Werte wurden verglichen und auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht.

3.3.6.1.2 Melatonin-ELISA zur Konzentrationsbestimmung von Melatonin in Speichel

Für die Bestimmung von Melatonin-Konzentrationen im Speichel wurde für die vorliegende Studie das „Non-Extraction Melatonin Saliva ELISA“-Kit der Firma IBL International verwendet. Auch hierbei handelt es sich um einen kompetitiven ELISA. Das Testprinzip gleicht dem des Cortisol-ELISAs, und soll hier deshalb nicht ausführlich dargelegt werden. In diesem Fall ist das im Kit enthaltene Antigen biotinyliert, und bei dem Enzym, dem das TMB als Substrat dient, handelt es sich um Streptavidinperoxidase. Es findet ebenfalls wieder eine Farbreaktion statt und anhand von Absorptionswerten, die mit einer Standardkurve verglichen werden, kann auf die Melatonin-Konzentrationen zurückgeschlossen werden. Alle Konzentrationsbestimmungen erfolgten in Duplikaten, um eventuelle Pippetier- oder Messfehler sofort erkennen zu können. Alle Proben eines Probanden wurden auf dieselbe ELISA-Platte aufgetragen und gleichzeitig gemessen. Untersucht wurden die Speichelproben, die am Probandentag um 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 und 24 Uhr in den Räumlichkeiten der Abteilung für Humanbiologie des Zoologischen Instituts der Christian Albrechts Universität zu Kiel gesammelt worden waren. Der Speichel wurde zunächst bei -20°C gelagert. Vor dem Auftragen der Proben in die Kavitäten der Mikrotiterplatte wurden die gesammelten Salivaproben bei Raumtemperatur aufgetaut und zehn Minuten lang bei

4°C und 3000 g abzentrifugiert. Dies diente dazu, sämtlichen Zelldebris, der sich auch im Speichel befindet, mögliche Essensreste etc. zu sedimentieren. Eine Sichtkontrolle stellte außerdem sicher, dass der Speichel nicht durch Blut kontaminiert war. Alle Herstelleranweisungen wurden strikt eingehalten. Im ersten Pippetierschritt wurden je 100 µl der im Kit enthaltenen Standards und Kontrollen sowie 100µl des Speichelproben-Überstands dem in Abbildung 29 dargestellten Schema entsprechend auf die Platte aufgetragen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAL A	CAL E	Sample 1	Sample 5	Sample 9	Sample 13	Sample 17	Sample 21	Sample 25	Sample 29	Sample 33	Sample 37
B	CAL A	CAL E	Sample 1	Sample 5	Sample 9	Sample 13	Sample 17	Sample 21	Sample 25	Sample 29	Sample 33	Sample 37
C	CAL B	CAL F	Sample 2	Sample 6	Sample 10	Sample 14	Sample 18	Sample 22	Sample 26	Sample 30	Sample 34	Sample 38
D	CAL B	CAL F	Sample 2	Sample 6	Sample 10	Sample 14	Sample 18	Sample 22	Sample 26	Sample 30	Sample 34	Sample 38
E	CAL C	Contr.1	Sample 3	Sample 7	Sample 11	Sample 15	Sample 19	Sample 23	Sample 27	Sample 31	Sample 35	Sample 39
F	CAL C	Contr.1	Sample 3	Sample 7	Sample 11	Sample 15	Sample 19	Sample 23	Sample 27	Sample 31	Sample 35	Sample 39
G	CAL D	Contr.2	Sample 4	Sample 8	Sample 12	Sample 16	Sample 20	Sample 24	Sample 28	Sample 32	Sample 36	Sample 40
H	CAL D	Contr.2	Sample 4	Sample 8	Sample 12	Sample 16	Sample 20	Sample 24	Sample 28	Sample 32	Sample 36	Sample 40

Abb. 29: Pipettierschema eines Melatonin ELISAs

Die Konzentrationen von Standards und Kontrollen sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tab. 12 Konzentrationen der Melatonin-Standards und -Kontrollen

Name	Konzentration(pg/ml)
CAL A	0,0
CAL B	0,5
CAL C	1,5
CAL D	5,0
CAL E	15,0
CAL F	50,0
Control 1	1,2 – 3,6
Control 2	16 - 34

Bei den an den Boden der Kavitäten adsorbierten Antikörpern handelte es sich um polyklonale anti-Kaninchen Immunglobuline G (IgG) aus der Ziege. Im nächsten Schritt wurden je 50 µl „Melatonin Antiserum“ zugegeben. Melatonin Antiserum enthält polyklonales Antiserum aus Kaninchen gegen Melatonin. Durch diesen Schritt, bei dem die auf dem Boden der Kavität befindlichen Anti-Kaninchen-Antikörper aus der Ziege an die Anti-

Melatonin-Antikörper aus dem Kaninchen binden, wird die Sensitivität des ELISAs erhöht. Der Antikörper aus dem Kaninchen fungiert praktisch als Bindeglied zwischen den Melatoninmolekülen und den Antikörpern aus der Ziege, die sich am Boden der Wells befinden. Dies ist nötig, da die Melatonin-Konzentrationen im Picogramm-pro-Milliliter-Bereich, also sehr niedrig, liegen. Die ELISA-Platte wurde mit einer durchsichtigen Haftklebefolie abgedeckt und vorsichtig für zehn Sekunden geschüttelt. Es schloss sich eine 16- bis 20-stündige Inkubation bei zwei bis acht Grad Celsius an. Während dieses Inkubationsschritts konkurrierte das biotinylierte Antigen (Melatonin) aus dem Kit und das nicht-biotinylierte Antigen (Melatonin aus der Probanden-Probe) um die begrenzte Anzahl an Bindungsstellen des Anti-Melatonin-Antikörpers aus dem Kaninchen. Die lange Inkubationszeit erklärt sich folgendermaßen: nach dem Inkubationsschritt findet ein Waschschrift statt, bei dem alle Moleküle, die nicht an die Antikörper am Kavitätenboden gebunden sind, entfernt werden. Wenn der Waschschrift erfolgt, bevor alle Bindestellen am Kavitätenboden besetzt sind, ist eine zuverlässige Messung nicht gewährleistet. Nach diesem Zeitraum wurde die Folie wieder entfernt und die Inkubationslösung verworfen. Nun wurde jede Kavität viermal mit je 250 µl Waschpuffer gewaschen und die restliche Flüssigkeit möglichst vollständig durch Ausklopfen der Platte auf Papiertüchern entfernt. Es folgte die Zugabe von je 100 µl Melatonin Biotinlösung in jede Kavität und ein erneutes Abdecken der Mikrotiterplatte mit einer Haftklebefolie. Eine zweistündige Inkubation erfolgte nun auf einem Orbitalschüttler bei 500 U/min. Nach diesem Zeitraum wurde die Lösung wiederum verworfen und die Platte viermal wie oben beschrieben gewaschen. Hierdurch wurde das nicht gebundene biotinylierte Antigen entfernt. Im Anschluss wurden 100 µl des Enzymkonjugats (Streptavidin konjugiert mit HRP) in jedes Well pipettiert und die Platte mit einer Haftklebefolie abgedeckt. Der folgende Inkubationsschritt dauerte eine Stunde und fand wiederum bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler und bei 500 Umdrehungen pro Minute statt. Auch diese Inkubationslösung wurde entfernt, die Platte viermal mit je 250 µl Waschpuffer pro Kavität gewaschen und verbliebener Waschpuffer durch Ausklopfen entfernt. Im darauf folgenden Schritt wurde jede Kavität mit 100 µl TMB Substratlösung (TMB als Substrat für Streptavidin-Peroxidase, damit Farbumschlag stattfindet) befüllt und die Mikrotiterplatte 15 min. auf einem Orbitalschüttler bei 500 U/min. inkubiert. Das antikörpergebundene biotinylierte Antigen wurde durch Streptavidin-Peroxidase als Marker und TMB als Substrat bestimmt. Die Substratreaktion wurde durch Zugabe von 100 µl TMB Stopplösung beendet. Bei der Stopplösung handelt es sich um einmolare Schwefelsäure (1M H₂SO₄). Diese inaktiviert die Streptavidin-Peroxidase. Durch die einhergehende Veränderung des pH-Werts Richtung sauer findet ein Farbumschlag von blau nach gelb statt.

Die Absorptionsmessung erfolgte in dem Gerät Tecan Genios bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450$ nm und einer Referenzwellenlänge von $\lambda = 620$ nm. Die sigmoidale Standardkurve, anhand derer wiederum die Konzentrationen der Proben errechnet wurden, wurde auf zwei Weisen berechnet:

1. mit Hilfe der Vier-Parameter-Analyse
2. durch die LogitLog-Berechnung

Beide Berechnungsmöglichkeiten wurden vom Hersteller des Melatonin-ELISA Kits empfohlen. In beiden Fällen wird die Standardkurve (Abb. 29) dargestellt, indem die OD-Werte der Standards auf die lineare Ordinate aufgetragen werden, ihre Konzentration wiederum auf die logarithmische Abszisse. Es entsteht eine sigmoidale Kurve.

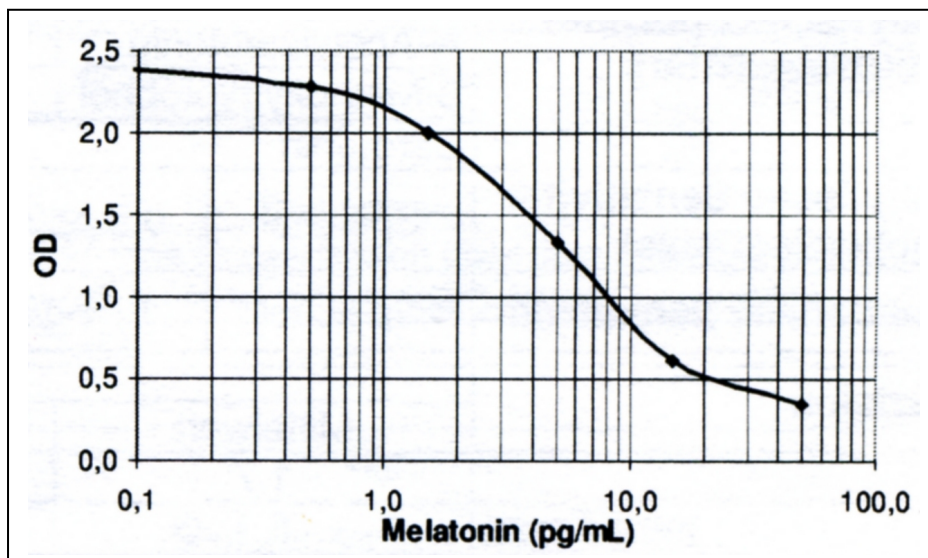


Abb. 29: Standardkurve eines Melatonin-ELISAs (verändert nach Bedienungsanleitung Melatonin-ELISA Kit)

In den Fällen, in denen die Konzentrationen der Probanden-Proben höher waren als die des höchsten Standards, wurden die Proben mit dem Kalibrator CAL A ($c = 0,0$ pg/ml) verdünnt und sämtliche Proben dieses Probanden wiederholt gemessen. Die erhaltenen Konzentrationen wurden in diesen Fällen anschließend unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors berechnet.

Berechnung des Dim Light Melatonin Onset (DLMO)

Da die Höhe der Melatonin-Konzentrationen bei verschiedenen Individuen stark schwanken kann, wurde in der vorliegenden Studie für jeden Probanden ein individueller DLMO berechnet. Hierzu wurde der Mittelwert der Melatonin-Konzentrationen von 17, 18 und 19 Uhr errechnet, und die doppelte Standardabweichung (SD) addiert:

$$\text{DLMO} = \frac{(C_{\text{Melatonin 17Uhr}} + C_{\text{Melatonin 18 Uhr}} + C_{\text{Melatonin 19 Uhr}})}{3} + (2 \times \text{SD})$$

So erhielt man die Melatonin-Konzentration, die dem Schwellenwert entspricht. Um den Zeitpunkt zu ermitteln, an dem dieser Wert erreicht wurde, wurde zunächst ein Koordinatensystem erstellt, bei dem die Uhrzeit der Abszisse und die Melatonin-Konzentration der Ordinate entsprach. In dieses Koordinatensystem wurden die drei Konzentrationen von 17, 18 und 19 Uhr eingetragen, und aus diesen Werten eine Gerade erstellt. Anhand der Geraden konnte nun minutengenau ermittelt werden, zu welchem Zeitpunkt die errechnete Konzentration erreicht wurde.

3.3.7 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Daten, die im Rahmen dieser Studie erhoben wurden, erfolgte zum Großteil mit Hilfe des Statistik-Programms SPSS (Version 15.0).

Begriffe

Im Folgenden sollen einige mathematische Begriffe erläutert werden, die für das Verständnis der in dieser Arbeit angewandten Statistik nötig sind.

Kategoriale Variablen

Diese liegen dann vor, wenn sich die Variablen in verschiedene Gruppen einteilen lassen, und diese Gruppen sich durch beispielsweise Ziffern codieren lassen. Sie lassen sich unterteilen in nominale und ordinale Variablen (Bühl 2008).

Nominalskalierte Variablen

Die verschiedenen Bedeutungen einer Variablen können codiert werden. Den Codierungsziffern kommt dabei keine empirische Bedeutung oder Gewichtung zu; sie könnten auch umgekehrt vergeben werden. Wenn verschiedene Gruppen miteinander verglichen werden sollen, ist es sinnvoll, diese durch Zahlen zu codieren. Beispiel: 1 = männlich, 2 = weiblich.

Nominalskalierte Variablen können einer Häufigkeitszählung unterzogen werden. Oft finden sie auch Anwendung, um eine Gesamtstichprobe nach den Kategorien der Variablen zu unterteilen und die Teilstichproben miteinander zu vergleichen (Bühl 2008).

Ordinalskalierte Variablen

Sie können ebenfalls codiert werden, allerdings haben die Codierungen hier eine empirische Relevanz hinsichtlich ihrer Ordnung.

Beispiel: 1 = Körperhöhe 1,50 bis 1,60 m

2 = Körperhöhe 1,61 bis 1,70 m

3 = Körperhöhe 1,71 bis 1,80 m

Die empirische Relevanz bedeutet hierbei, dass jemand, der in die Gruppe 2 fällt, automatisch größer ist als jemand in der Gruppe 1, jemand aus der Gruppe 3 größer ist als jemand aus der Gruppe 1 und 2 usw.

In diesem Fall ist neben der Häufigkeitsauszählung auch die Berechnung statistischer Kennzahlen wie dem Median möglich. Der Zusammenhang zwischen ordinalskalierten Variablen kann durch einen Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman festgestellt werden (Bühl 2008).

Intervallskalierte Variablen

Dies sind Variablen, bei denen die Werte nicht nur eine Rangordnung wiedergeben, sondern auch den Differenzen zweier Werte eine empirische Bedeutung zukommt. So etwa bei dem Intelligenz Quotienten (IQ).

Beispiel: Person A hat einen IQ von 80

Person B hat einen IQ von 120

Person C hat einen IQ von 160

Hier kann man sagen, dass Person C um ebensoviel intelligenter ist als Person B, wie Person B im Vergleich zu Person A – nämlich um 40 IQ-Punkte. Trotzdem wird man nicht sagen können, dass Person doppelt so intelligent ist wie Person A, auch wenn der Zahlenwert der Variablen doppelt so hoch ist. Die Bearbeitung solcher Variablen unterliegt keiner methodischen Einschränkung. So ist z.B. der Mittelwert ein sinnvoller statistischer Kennwert zur Beschreibung dieser Variablen (Bühl 2008).

Verhältnisskalierte Variablen

Bei diesem Variablen-Typ kommt auch den Verhältnissen zweier Variablen eine empirische Bedeutung zu.

Beispiel: Person A ist 30 Jahre alt

Person B ist 60 Jahre alt

Hier kann man feststellen, dass Person B doppelt so alt ist wie Person A.

Alle intervallskalierten Variablen, die einen absoluten Nullpunkt besitzen, sind gleichzeitig verhältnisskaliert (Bühl 2008).

Metrische Variablen

Die Werte dieser Variablen haben (meist) eine Einheit (Bühl 2008).

Beispiel: 12,4 cm

Abhängigkeit und Unabhängigkeit von Variablen

Zwei Stichproben sind dann voneinander abhängig (auch: gebunden, gepaart), wenn jedem Wert der einen Stichprobe auf sinnvolle und eindeutige Weise genau ein Wert der anderen Stichprobe zugeordnet werden kann. Entsprechendes gilt für den Fall von mehreren abhängigen Stichproben. Dies ist beispielsweise dann der Fall, wenn eine Messung mehrmals, zu unterschiedlichen Zeitpunkten an einer Person stattgefunden hat. Die Werte zu den verschiedenen Zeitpunkten führen dann zu abhängigen Stichproben. Besteht keine Wertezuordnung zwischen den Stichproben, so liegen unabhängige Stichproben vor (z.B. Männer versus Frauen). In SPSS beinhalten unabhängige Stichproben unterschiedliche Fälle (z.B. verschiedene Probanden), die in der Regel mit Hilfe einer nominalskalierten Gruppierungsvariablen unterschieden werden (Bühl 2008).

Die Irrtumswahrscheinlichkeit p

Aufgabe der analytischen Statistik ist es, objektiv zu unterscheiden, ob z.B. ein auftretender Mittelwertsunterschied zufällig zustande gekommen ist, oder nicht.

Hierzu werden zunächst zwei Thesen formuliert:

1. Die Nullhypothese. Sie besagt, dass die beiden zu untersuchenden Stichproben der gleichen Grundgesamtheit entstammen und ein Mittelwertsunterschied somit zufällig zustande gekommen ist.
2. Die Alternativhypothese. Sie besagt, dass die beiden Stichproben verschiedenen Grundgesamtheiten entstammen, und ein Mittelwertsunterschied nicht zufällig zustande gekommen ist.

Statistische Verfahren erlauben es, die Wahrscheinlichkeit zu errechnen, mit der man sich irrt, wenn man die Nullhypothese ablehnt. Diese Wahrscheinlichkeit ist die Irrtumswahrscheinlichkeit p . Ihr Wert liegt zwischen Null und eins.

$$0 \leq p \leq 1$$

Das Ablehnen der Nullhypothese, obwohl sie richtig ist, ist ein „Fehler erster Art“. Als „Fehler zweiter Art“ bezeichnet man den Fall, dass die Nullhypothese beibehalten wird, obwohl sie falsch ist. Die Wahrscheinlichkeit, einen Fehler erster Art zu begehen, ist also definitionsgemäß gleich der Irrtumswahrscheinlichkeit p . Die Wahrscheinlichkeit, einen Fehler zweiter Art zu begehen ist umso kleiner, je größer die Irrtumswahrscheinlichkeit p ist. Im allgemeinen werden Aussagen, die mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ behaftet sind als „signifikant“ bezeichnet. Solche mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,01$ sind „sehr signifikant“, und wenn eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,001$ vorliegt „höchst signifikant“. In Abbildungen können diese Abstufungen durch die Verwendung von ein, zwei oder drei Sternchen-Symbolen dargestellt werden (Bühl 2008) (Tab. 13).

Tab. 13: Einteilungen, Sprachgebrauch und Symbolisierung der Irrtumswahrscheinlichkeit p

Irrtumswahrscheinlichkeit	Bedeutung	Symbolisierung
$p > 0,05$	Nicht signifikant	ns
$p \leq 0,05$	signifikant	*
$p \leq 0,01$	sehr signifikant	**
$p \leq 0,001$	höchst signifikant	***

p = Irrtumswahrscheinlichkeit; ns = nicht signifikant

Standardabweichung

Die Standardabweichung ist ein Maß für die Streuung von Messwerten. Sie ist definiert als Quadratwurzel aus der Varianz. Trägt man die Standardabweichung zu beiden Seiten des Mittelwerts auf, so liegen bei normalverteilten Werten ca. 67% der Werte in diesem Intervall (Bühl 2008).

Standardfehler

Gemeint ist hierbei der Standardfehler des Mittelwerts. Trägt man den Standardfehler zu beiden Seiten des Mittelwerts auf, liegt mit etwa 67%iger Wahrscheinlichkeit der Mittelwert der Grundgesamtheit in diesem Intervall. Der Standardfehler errechnet sich aus der Standardabweichung, indem man sie durch die Quadratwurzel des Stichprobenumfangs dividiert (Bühl 2008).

Mittelwert

Der Mittelwert ist definiert als das arithmetische Mittel der Messwerte und berechnet sich aus der Summe der Messwerte geteilt durch ihre Anzahl (Bühl 2008).

Statistische Tests

Im Folgenden sollen die statistischen Tests genannt werden, die in dieser Arbeit Anwendung fanden. Außerdem soll dargelegt werden, zu welchem Zweck die verschiedenen Tests verwendet werden, und welche Voraussetzungen erfüllt sein müssen, um die jeweiligen Tests anwenden zu können.

Test auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test

Bei einer Normalverteilung sind die meisten Werte um den Mittelwert gruppiert, während die Häufigkeiten nach beiden Seiten hin gleichmäßig, in Form einer „Gaußschen Glockenkurve“, abfallen (Abb. 30) (Bühl 2008).

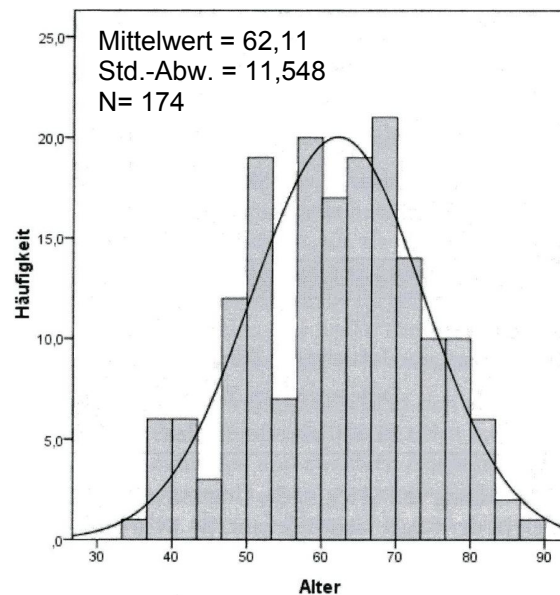


Abb. 30: Normalverteilung. Dargestellt sind die Alters-Häufigkeiten in einer Gruppe von 174 Menschen. Die Kurve zeigt die optimale Normalverteilung an (Quelle Bühl 2008, S. 118)

Die Anwendung zahlreicher Verfahren setzt die Normalverteilung der Variablen-Werte voraus. Allerdings kommen genau normalverteilte Werte in der Praxis so gut wie nie vor. Es kann daher nur überprüft werden, ob die vorliegenden Werte hinreichend normalverteilt sind, d.h. nicht signifikant von der Normalverteilung abweichen. Vor Anwendung eines Tests, der eine Normalverteilung voraussetzt, ist diese also zu überprüfen.

Nach Durchführung des Tests in SPSS wird dem Nutzer neben Mittelwert und Standardabweichung auch die Irrtumswahrscheinlichkeit p angegeben. Eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung besteht bei $p < 0,05$. In diesem Falle sind gegebenenfalls für die betreffenden Variablen nichtparametrische Tests zu benutzen. Bei

einem Wert von $p \geq 0,05$ sind die Werte hinreichend normalverteilt, so dass im Weiteren Tests auf die Variablen angewendet werden können, die eine Normalverteilung voraussetzen (Bühl 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test angewendet, um die Werte verschiedener Variablen auf Normalverteilung zu überprüfen. Das Ergebnis des Kolmogorov-Smirnov-Tests entschied beispielsweise darüber, ob der t-Test nach Student für Mittelwertvergleiche einer Variablen zwischen zwei Gruppen angewendet werden konnte.

Mittelwerttests

Häufig tritt die Situation auf, dass Mittelwerte verschiedener Stichproben miteinander verglichen werden sollen. Für die Entscheidung, mit welchem Test dieser Vergleich errechnet werden soll, ist unter anderem entscheidend, ob es sich um abhängige oder unabhängige Variablen handelt.

In der vorliegenden Arbeit wurden unabhängige Stichproben miteinander verglichen. Hierfür fand entweder der t-Test nach Student oder der U-Test nach Mann und Whitney Anwendung. Beide Tests sollen nun ausführlicher beschrieben werden.

t-Test nach Student

Dieser Test eignet sich zum Vergleich von Mittelwertunterschieden einer Variablen in zwei unabhängigen Stichproben. Er setzt die Normalverteilung der Daten voraus. Bei dem Vergleich von verschiedenen Stichproben hinsichtlich ihrer Mittelwerte soll die Frage beantwortet werden, ob auftretende Mittelwertunterschiede sich mit zufälligen Schwankungen erklären lassen, oder ob es Abhängigkeiten gibt. Wenn sich die Unterschiede nicht mit zufälligen Schwankungen erklären lassen, spricht man von einem überzufälligen oder signifikanten Unterschied. Hierbei bedeutet $p > 0,05$, dass keine signifikanten Unterschiede bestehen. Liegt ein Wert von $p \leq 0,05$ vor, ist ein statistisch signifikanter Unterschied vorhanden, bei $p \leq 0,01$ tritt ein statistisch sehr signifikanter Unterschied auf und bei $p \leq 0,001$ liegt ein statistisch höchst signifikanter Unterschied vor. Je nachdem, ob Varianzgleichheitbestand (geprüft mit F-Test nach Levine) wurde ein t-Test für gleiche bzw. ungleiche Varianzen angewendet.

Der t-Test setzt die Normalverteilung der Variablen-Werte voraus. Sind die Werte nicht normalverteilt, kann der nichtparametrische U-Test nach Mann und Whitney Anwendung finden (Bühl 2008).

U-Test nach Mann und Whitney

Dieser Test wird ebenfalls verwendet, um Mittelwertvergleiche einer Variablen in zwei unabhängigen Stichproben anzustellen. Allerdings setzt er keine Normalverteilung voraus (Bühl 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde der t-Test für unabhängige Stichproben bzw. der U-Test angewendet, um festzustellen, ob es Unterschiede zwischen Gruppen gibt, die sich hinsichtlich Alter, Geschlecht oder Schlafqualität unterscheiden.

Korrelationskoeffizient nach Pearson

Eine Korrelation bezeichnet die Stärke des Zusammenhangs zwischen zwei Variablen. Er setzt eine Normalverteilung der Daten voraus. Ein Korrelationskoeffizient (r) kann auch als Zusammenhangsmaß bezeichnet werden. Seine Werte liegen zwischen -1 und $+1$. Ein Wert nahe Null bedeutet einen schwachen Zusammenhang und ein Wert nahe 1 einen starken Zusammenhang. Das Vorzeichen gibt dabei die Richtung an (Bühl 2008).

Beispiel: Der Zusammenhang der Variablen „Drücken eines Lichtschalters“ und „das Licht geht an“ soll getestet werden. Ein Korrelationskoeffizient von $+1$ würde bedeuten, dass das Licht immer angeht, wenn der Lichtschalter gedrückt wird. Ein Korrelationskoeffizient von -1 würde bedeuten, dass das Licht nie angeht, wenn der Lichtschalter gedrückt wird.

In nachfolgender Tabelle (Tab.14) ist die üblichen Abstufungen mit dem verwendeten Sprachgebrauch aufgeführt.

Tab.14: Korrelations-Grenzen und Begriffe (Bühl 2008).

Wert	Interpretation
bis 0,2	sehr geringe Korrelation
bis 0,5	geringe Korrelation
bis 0,7	mittlere Korrelation
bis 0,9	hohe Korrelation
über 0,9	sehr hohe Korrelation

Die Berechnung basiert auf Wertepaaren, die aus den zugrunde liegenden abhängigen Stichproben gebildet werden. Für eine graphische Darstellung kann ein Streudiagramm verwendet werden. Angestrebt ist ein linearer Zusammenhang.

Der Korrelationskoeffizient nach Pearson prüft den Zusammenhang zwischen zwei intervallskalierten und normalverteilten Variablen und wird mit folgender Formel berechnet:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \times (y_i - \bar{y})}{(n - 1) \times s_x \times s_y}$$

Wobei x_i und y_i die Werte der beiden Variablen, \bar{x} und \bar{y} deren Mittelwerte und s_x und s_y deren Standardabweichungen sind. Die Anzahl der Wertepaare ist n . Der Korrelationskoeffizient r wird vom SPSS-Programm zusammen mit der Irrtumswahrscheinlichkeit p ausgegeben (Bühl 2008). Alle in dieser Arbeit angegebenen r -Werte wurden beidseitig berechnet.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson angewendet, um Zusammenhänge zwischen verschiedenen Variablen zu ermitteln, die beispielsweise mit dem Auftreten von Schlafstörungen in Zusammenhang stehen könnten.

Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman

Bei ordinalskalierten oder nichtnormalverteilten intervallskalierten Variablen wird anstelle des Korrelationskoeffizienten nach Pearson die Rangkorrelation nach Spearman berechnet. Bei dieser werden zunächst den einzelnen Werten Rangplätze zugeordnet, die dann in einer entsprechenden Formel weiterverarbeitet werden (Buhl 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman verwendet, um Korrelationen mit nicht-normalverteilten Variablen durchzuführen.

Regressionsanalyse

Die Regressionsanalyse ermöglicht es, die Art eines Zusammenhangs zwischen zwei Variablen zu ermitteln bzw. Möglichkeiten an die Hand zu geben, den Wert einer abhängigen Variable aus den Werten anderer, unabhängiger, Variablen vorherzusagen.

Besonders die einfache lineare Regression ist dazu geeignet, den grundsätzlichen Gedanken der Regression zu verdeutlichen. So kann man beispielsweise ein Streudiagramm erstellen, in welchem man auf der Abszisse die Werte einer Messung, beispielsweise die Cholesterinwerte von Probanden zu einem bestimmten Zeitpunkt, angibt, und auf der Ordinate die Cholesterinwerte der Probanden bei einer Wiederholungsmessung einen Monat später. Legt man nun eine Regressionsgerade durch die Werte, so erhält man ein Bild, wie es in Abbildung 31 dargestellt ist.

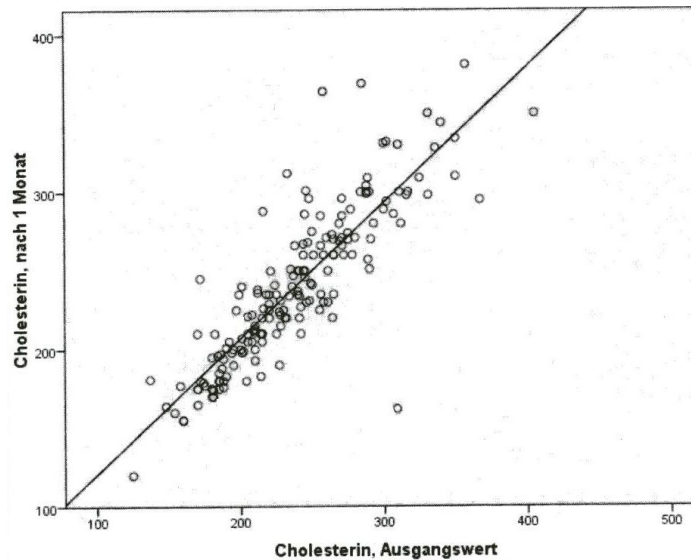


Abb. 31: Streudiagramm mit Regressionsgeraden

Der Zusammenhang beider Variablen ist deutlich erkennbar: beide Variablen gehen in die selbe Richtung, und bis auf wenige Ausnahmen liegen die Werte nahe an der Regressionsgeraden. Man spricht daher von einem linearen Zusammenhang.

Die Berechnung erfolgt mit Hilfe der folgenden Formel:

$$Y = b \cdot x + a$$

Wobei b den Regressionskoeffizienten und a den Ordinatenabschnitt bezeichnet. Der Ordinatenabschnitt gibt den Punkt auf der Ordinate an, an dem diese sich mit der Regressionsgeraden schneidet. Der Regressionskoeffizient b hängt ab vom Steigungswinkel α der Regressionsgeraden.

Als optimale Regressionsgerade gilt die Gerade, bei der die Summe der quadrierten vertikalen Abstände von den einzelnen Messpunkten minimal wird. Die Aufgabe der linearen Regression ist es, die Parameter a und b abzuschätzen (Bühl 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurden Regressionsanalysen verwendet, um mit Hilfe von erstellten Regressionsgeraden bivariate Zusammenhänge zu verdeutlichen.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung von Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Methoden etabliert. Die Ergebnisse sollen zunächst kurz vorgestellt werden.

4.1.1 Etablierung von Hormonanalysen

Während dieser Arbeit wurden Analysen der beiden Hormone Melatonin und Cortisol, deren Synthese einem circadianen Rhythmus unterliegt, mit Hilfe von ELISAs durchgeführt. Hierfür wurden die beiden Kits „Non-Extraction Melatonin Saliva ELISA“ und „Cortisol ELISA“, beide von der Firma IBL International, verwendet. Das erstgenannte Kit hatte seine Markteinführung im Laufe dieser Studie, und die Autorin war somit eine der ersten Anwenderinnen. Es zeigte sich, dass in der ersten Version des Kits Standards geliefert wurden, die eine zu geringe Konzentrationsbreite aufwiesen. Dies führte dazu, dass mehrere Proben zunächst nicht gemessen werden konnten. Dies wurde mittlerweile vom Hersteller geändert, sodass nun einerseits die Möglichkeit vorliegt, Proben mit sehr hohen Melatonin-Konzentrationen zu verdünnen. Außerdem decken die neuen Standards auch höhere Melatonin-Konzentrationen ab. Beide Kits sind somit gut anwendbar und liefern zuverlässige Ergebnisse. Die Protokolle wurden ohne Veränderungen der Herstellerangaben angewendet. Die Absorptionmessungen erfolgten auf dem Gerät TECAN Reader. Auch dieses Gerät stellte sich als zuverlässig heraus. Dieses Gerät ist mit einem Computer verbunden, der mit Hilfe des Magellan-Programms die Standardkurven der ELISA-Läufe erstellt, und anhand dieser Standardkurven die Hormon-Konzentration in den Speichelproben der Probanden errechnet. Die Abbildung 32 zeigt exemplarisch jeweils eine Standardkurve für Cortisol (A), und eine für Melatonin (B). Eingetragen sind jeweils die optischen Dichten, die in den Kavitäten der Standards mit bekannter Konzentration gemessen wurden. Durch die semi-logarithmische Darstellung erhält die Standardkurve eine sigmoidale Form.

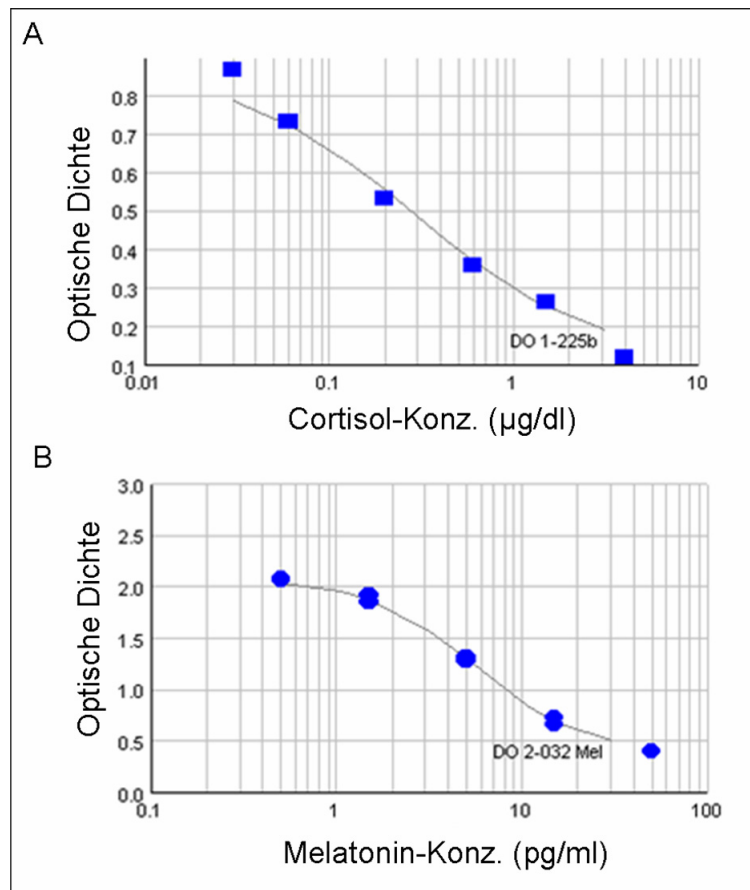


Abb. 32: Standardkurven von Cortisol- und Melatonin-ELISA. A: Standardkurve des Cortisol-ELISAs. B : Standardkurve des Melatonin-ELISAs. Eingezeichnet sind jeweils die optischen Dichten, die in den Kavitäten der Standards während der Absorptionsmessungen im ELISA-Gerät gemessen wurden. Die Konzentration der Standards sind bekannt. Durch die semi-logarithmische Darstellung ergibt sich eine sigmoidale Kurvenform. Die Angaben „DO 1-225b“ bzw. „DO 2-032 Mel“ beziehen sich auf die Benennung des Laufs und werden vom Programm automatisch eingefügt.

4.1.2 Etablierung von Expressionsanalysen

Für die Durchführung von Expressionsanalysen konnten im Rahmen dieser Arbeit folgende Methoden erfolgreich etabliert werden:

- RNA-Extraktion aus Mundschleimhaut mittels Kit
- RNA-Extraktion aus Mundschleimhaut mittels Phenol-Chloroform-Extraktion
- enzymatische Spaltung mittels DNaseI
- cDNA-Synthese
- Standard-PCR auf dem Blockcyler
- Real-Time-PCR auf dem LightCycler und Verwendung des UPL-Sondensystems
- Erstellung von Standardkurven mit der LightCycler Software
- Erstellung von Coefficient Files mit der RelQuant-Software
- Relative Quantifizierung mit der RelQuant-Software

Die Etablierungsergebnisse der aufgeführten Methoden sollen nachfolgend erläutert werden.

4.1.2.1 Nachweis der extrahierten RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Wie bereits im Methodenteil ausgeführt wurde, wurden während der Etablierung von RNA aus Mundschleimhaut mehrere Kits von verschiedenen Herstellern daraufhin getestet, ob sie für die Extraktion von RNA aus Mundschleimhaut geeignet waren. Abbildung 33 zeigt ein Gel mit elektrophoretisch aufgetrennter RNA, die mit Hilfe des „CRYSTAL RNA Mini-Kit“ der Firma Biolab extrahiert wurde. Dieses Kit ist sehr unkompliziert in der Verwendung und zeigte sowohl die höchste RNA-Ausbeute als auch die größte Reinheit. Es wurde deshalb in dieser Arbeit verwendet.

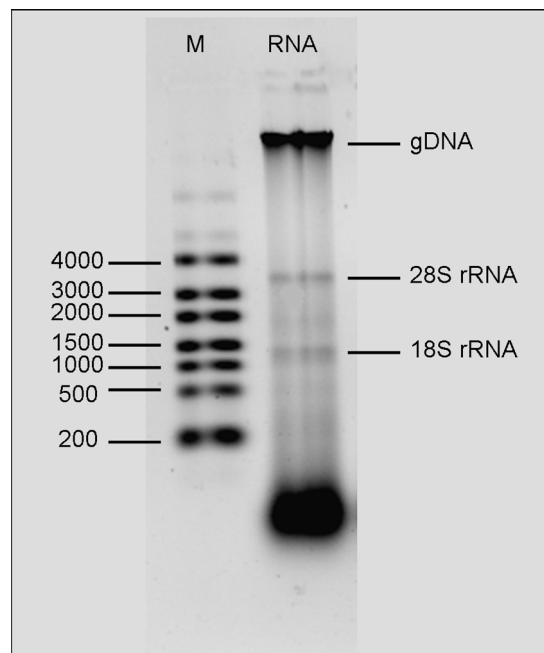


Abb. 33: Einprozentiges Agarosegel mit elektrophoretisch aufgetrennter Gesamt-RNA. Die RNA wurde mit Hilfe des CRYSTAL RNA Mini-Kits extrahiert. In der linken Spur (M) befindet sich der Standard (RiboRuler™ RNA Ladder, High Range), die Zahlen geben an, wiviele Nucleotide lang die RNA-Abschnitte sind, die sich in der zugehörigen Bande befinden. In der rechten Spur wurden 3,16µg Gesamt-RNA aufgetrennt. Die RNA stellt sich als Schmier dar, aus dem die gDNA-Bande sowie die beiden rRNA-Banden herausstechen. Gekennzeichnet sind die Banden, die die 18S-rRNA und die 28S-rRNA, sowie die genomische DNA enthalten.

Die Phenol-Chloroform-Extraktion lieferte vergleichbare Ergebnisse. Sie sollen deshalb nicht extra aufgeführt werden.

4.1.2.2 Erfolgskontrolle der cDNA-Synthese

Im Methodenteil wurde erläutert, welche cDNA-Synthese-Kits im Rahmen dieser Arbeit daraufhin getestet wurden, wie effizient die Synthese von cDNA aus RNA war. Im Rahmen dieser Arbeit wurde schließlich das „Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit“ der Firma Roche verwendet. Entscheidend für die Verwendung dieses Kits war die Tatsache, dass es die höchste Effektivität bei der Synthese von cDNA zeigte. Weiterhin weist dieses Kit

Ergebnisse

mehrere Vorteile auf. So bietet es die Möglichkeit, sowohl Random-Hexamer-Primer, als auch Anchored-oligo-(dT)₁₈-Primer zu verwenden, und die im Kit enthaltene Polymerase weist eine RNase-H-Aktivität auf.

Die Erfolgskontrolle der cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe einer elektrophoretischen Auftrennung des Produkts auf einem einprozentigen Agarosegel. Die Abbildung 34 zeigt ein solches Gel.

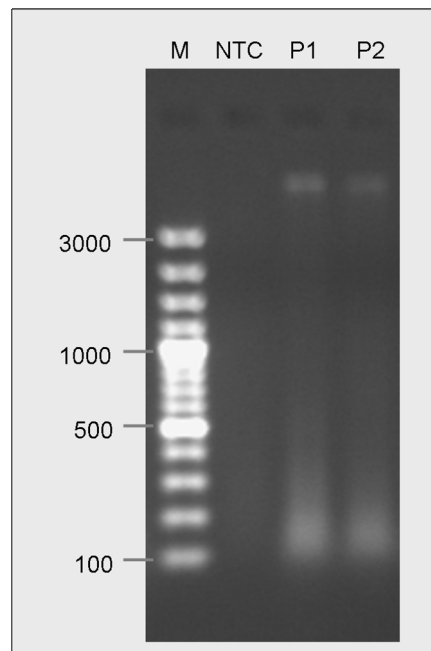


Abb. 34: Einprozentiges Agarosegel mit elektrophoretisch aufgetrennter cDNA. In der linken Spur ist der Standard (M) aufgetragen. Es handelt sich um den 100bp-Standard „O’GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus“. In der zweiten Spur wurde eine Leerprobe (NTC) aufgetragen, in den Spuren drei und vier sind die cDNA-Proben zwei verschiedener Probanden (P1, P2) aufgetragen.

In der linken Spur des Gels ist der 100 bp-Marker „O’GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus“ der Firma Fermentas aufgetragen. In der zweiten Spur wurde eine Leerkontrolle (NTC) aufgetragen, bei der keine RNA zum cDNA-Synthese-Ansatz zugegeben wurde. Da in dieser Spur kein Signal erkennbar ist, ist eine Kontamination auszuschließen. Anhand des Schmiere, der sowohl bei Proband eins (P1), als auch Proband zwei (P2) auftritt wurde hier nachgewiesen, dass sich cDNA in dem Ansatz befindet bzw. dass die cDNA-Synthese erfolgreich verlaufen ist.

4.1.2.3 Optimierung des LightCycler-Laufs für Ziel- und Haushaltsgene

Um PCRs auf einem LightCycler zu etablieren, wurden zunächst Gradienten-PCRs auf einem Block-Cycler durchgeführt. Dies diente dazu, die Temperatur herauszufinden, bei der die Anlagerung der Oligonucleotide optimal verläuft. Außerdem konnte anhand von Gelbildern überprüft werden, ob mit den verwendeten Oligonucleotiden eine einzelne

spezifische Produktbande entstand, und ob sich Primerdimere bildeten. In der Abbildung 35 sind Gelbilder aller in dieser Arbeit verwendeten Gene dargestellt.

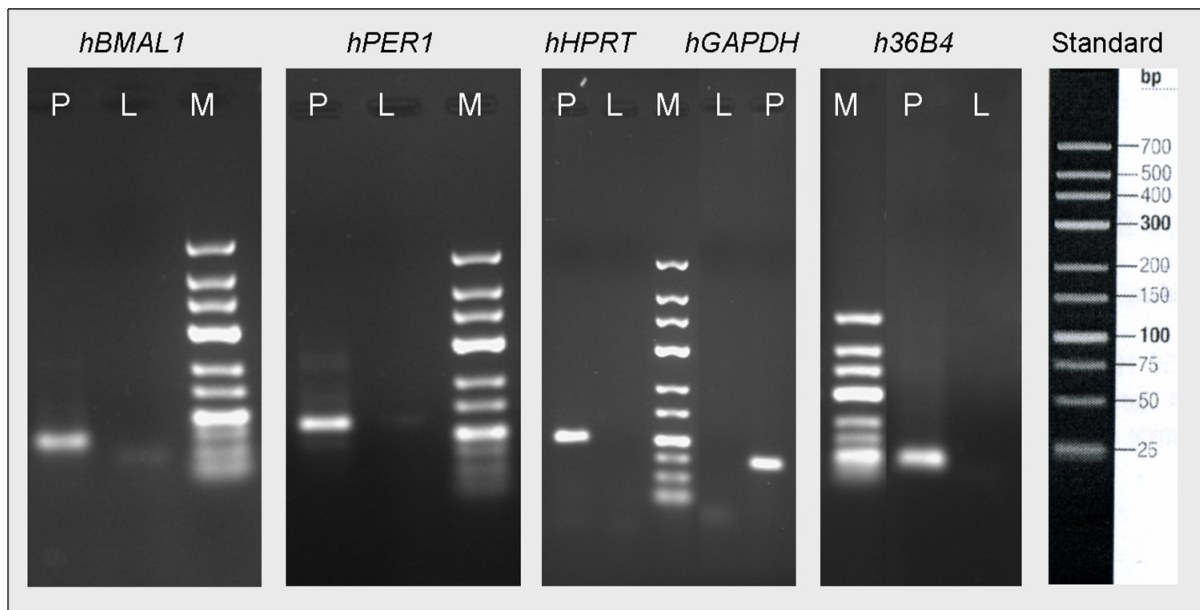


Abb. 35: Gelbilder der fünf in dieser Studie untersuchten Gene. Dargestellt ist jeweils ein Gelbild der Zielgene *hBMAL1* und *hPER1* sowie der drei Haushaltsgene *hHPRT*, *hGAPDH* und *h36B4*. In allen Fällen wurde derselbe Standard (M) verwendet. Da es sich um unterschiedliche Gele mit unterschiedlichen Laufzeiten handelt, wurde die Bedeutung der Banden nicht direkt an das Gel geschrieben, sondern ganz rechts wird ein Schema der Gelbanden des Standards gezeigt. In einer der Spuren ist jeweils das PCR-Produkt (P) aufgetragen, in einer der Spuren die Leerkontrolle (L). Man kann jeweils eine einzelne Bande des jeweiligen PCR-Produkts erkennen. In keiner der Leerproben ist eine Bande, sodass eine Kontamination auszuschließen ist. Es gibt keine Hinweise auf Primerdimere.

Anhand dieser Gelbilder konnte nachgewiesen werden, dass in den durchgeführten PCRs jeweils das PCR-Produkt mit der vorhergesagten Größe amplifiziert wurde. Die erwarteten Amplikon-Längen sind in der Tabelle 15 aufgeführt. Weiterhin konnte anhand der mitgeführten Negativ-Kontrollen überprüft werden, dass das Amplikon nicht aufgrund einer Kontamination zustande kam. Es gibt keine Hinweise darauf, dass sich Primerdimere gebildet haben könnten.

Tab. 15: Übersicht über die Amplikonlängen der fünf in dieser Arbeit verwendeten Gene

Gen	Amplikonlänge
<i>hBMAL1</i>	66 bp
<i>hPER1</i>	121 bp
<i>h36B4</i>	96 bp
<i>hGAPDH</i>	66 bp
<i>hHPRT</i>	102 bp

Nachdem diese PCRs erfolgreich reproduziert worden waren, wurden die Erkenntnisse über beispielsweise die Anlagerungstemperatur genutzt, um PCRs auf dem LightCycler durchzuführen. Da die PCR-Parameter nicht exakt übertragen werden konnten, wurden für die Echtzeit-PCRs abschließend weitere Abwandlungen des Protokolls daraufhin überprüft, ob sie in einer Optimierung der PCR resultierten. Diese Abwandlungen bezogen sich hauptsächlich auf verschiedene Oligonucleotid-Konzentrationen und Anlagerungstemperaturen.

4.1.2.4 Durchführung des LightCycler-Laufs für Ziel- und Haushaltsgene

Die Durchführung von Echtzeit-PCRs auf dem LightCycler zur relativen Quantifizierung von Uhgengen konnte in dieser Arbeit erfolgreich etabliert werden. Das letztendlich verwendete Echtzeit-PCR-Programm wurde bereits im Methodenteil (Tab. 9) gezeigt. Gleiches gilt für die verwendeten Anlagerungstemperaturen (Tab. 8). Abbildung 36 zeigt exemplarisch die Fluoreszenz-Kurven einer in dieser Arbeit durchgeführten Echtzeit-PCR für das Gen *hPER1*. Während etwa der ersten 27 Zyklen ist die Fluoreszenz so niedrig, dass das Hintergrundsignal nicht überschritten wird. Der Crossingpoint wird in den meisten Ansätzen etwa zwischen dem 28. und 31. Zyklus erreicht (Threshold-Cycle, C_t). Es ist davon auszugehen, dass, je später der Crossingpoint erreicht wird, desto weniger genspezifische Matrize im Ansatz vorhanden war. Im vorliegenden Fall bedeutet dies, dass in zwei Ansätzen sehr wenig Matrize vorhanden war. In diesen beiden Ansätzen, die Duplikate sind, wird der Crossingpoint erst etwa im 35. Zyklus überschritten. Dies kann z.B. daran liegen, dass das untersuchte Gen zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion nur sehr schwach in den Zellen des Probanden exprimiert wurde. Die Tatsache, dass die Kurven dieser beiden Duplikate so dicht beieinander verlaufen, schließt einen Pippetierfehler o.a. aus. Die beiden Ansätze, in denen die Negativkontrolle enthalten war, verlaufen bis zum Ende der PCR auf Höhe der Null-Linie.

Ergebnisse

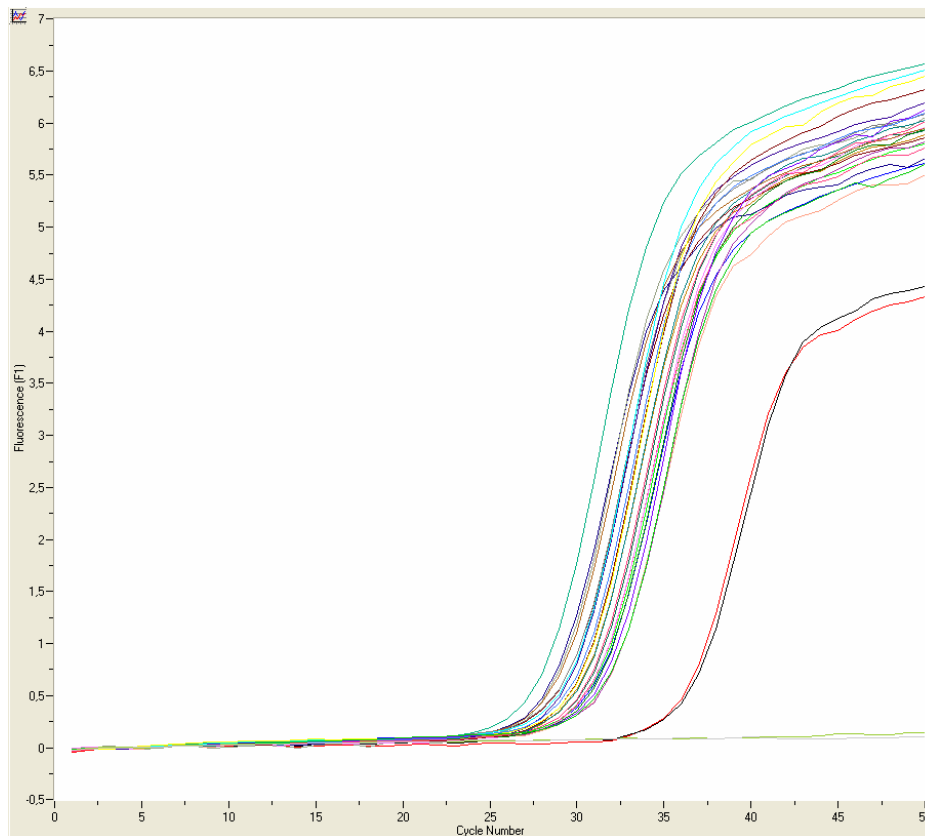


Abb. 36: Fluoreszenzkurven einer Echtzeit-PCR auf dem LightCycler-Gerät. Auf der Abszisse sind die PCR-Zyklen aufgetragen, auf der Ordinate die Stärke des Fluoreszenz-Signals, das nach den einzelnen Zyklen gemessen wurde. In einem Großteil der Ansätze tritt das Fluoreszenz-Signal zwischen dem 28. und 31. Zyklus aus dem Hintergrund hervor (Crossingpoint, C_p). In zwei Ansätzen war nur wenig Matrize vorhanden, und der Crossingpoint wird erst etwa im 35. Zyklus erreicht. Die Kurven der beiden Negativ-Kontrollen verlaufen bis zum Ende der PCR auf Höhe der Null-Linie.

Die Abbildung 37 zeigt ebenfalls exemplarisch die Angaben, die der Nutzer nach einem PCR-Lauf von der LightCycler-Software bekommt. Besonders interessant ist hierbei der errechnete Crossingpoint (blau umrandet), der für jeden Ansatz angezeigt wird. Alle Ansätze wurden in Duplikat geführt. Im unteren Teil der Abbildung wird unter „Grouped means“ der Crossingpoint angegeben, den das Programm aus den zusammengehörigen Duplikaten errechnet hat. „Grouped S.D.“ gibt die Standardabweichung an. Bei den Ansätzen 27 und 28 handelt es sich um die Negativ-Kontrollen. Die Fluoreszenz in diesen beiden Ansätzen trat während des Laufs nicht aus dem Hintergrundsignal hervor. Dementsprechend gibt es für diese beiden Ansätze keine Werte, und es ist damit nachgewiesen, dass keine Kontamination vorlag. In der Spalte „Calculated Concentration“ ist jeweils ein Null-Wert angegeben, weil in diesen Ansätzen Proben von Probanden amplifiziert wurden. Eine absolute Konzentration war also nicht bekannt und diese Werte wurden wie vorher erläutert für die relative Quantifizierung eingesetzt.

Pos...	Name	Calculated Concentration	Crossing Point
9	Prob 59 20h	0.000E+00	31.74
10	Repli. of Prob 59 20h	0.000E+00	31.88
11	Prob 59 22h	0.000E+00	30.25
12	Repli. of Prob 59 22h	0.000E+00	30.31
13	Prob 59 24h	0.000E+00	29.42
14	Repli. of Prob 59 24h	0.000E+00	29.48
15	Prob 60 8h	0.000E+00	30.97
16	Repli. of Prob 60 8h	0.000E+00	31.22
17	Prob 60 12h	0.000E+00	29.57
18	Repli. of Prob 60 12h	0.000E+00	30.09
19	Prob 60 16h	0.000E+00	27.99
20	Repli. of Prob 60 16h	0.000E+00	28.83
21	Prob 60 20h	0.000E+00	29.68
22	Repli. of Prob 60 20h	0.000E+00	29.92
23	Prob 60 22h	0.000E+00	30.23
24	Repli. of Prob 60 22h	0.000E+00	30.69
25	Prob 60 24h	0.000E+00	31.63
26	Repli. of Prob 60 24h	0.000E+00	31.78
27	H2O		
28	Repli. of H2O		
1,2	Grouped Means	0.000E+00	31.10
	Grouped S.D.	0.000E+00	0.0671
3,4	Grouped Means	0.000E+00	36.12
	Grouped S.D.	0.000E+00	0.232
5,6	Grouped Means	0.000E+00	30.86
	Grouped S.D.	0.000E+00	0.0830
7,8	Grouped Means	0.000E+00	28.60
	Grouped S.D.	0.000E+00	0.166
9,10	Grouped Means	0.000E+00	31.81
	Grouped S.D.	0.000E+00	0.0939
11,12	Grouped Means	0.000E+00	30.28
	Grouped S.D.	0.000E+00	0.0426
13,14	Grouped Means	0.000E+00	29.45
	Grouped S.D.	0.000E+00	0.0454
15,16	Grouped Means	0.000E+00	31.10
	Grouped S.D.	0.000E+00	0.179
17,18	Grouped Means	0.000E+00	29.83
	Grouped S.D.	0.000E+00	0.363
19,20	Grouped Means	0.000E+00	28.41
	Grouped S.D.	0.000E+00	0.594
21,22	Grouped Means	0.000E+00	29.80
	Grouped S.D.	0.000E+00	0.170
23,24	Grouped Means	0.000E+00	30.46
	Grouped S.D.	0.000E+00	0.330
25,26	Grouped Means	0.000E+00	31.70
	Grouped S.D.	0.000E+00	0.104
27,28	Grouped Means		
	Grouped S.D.		

Abb. 37: Liste mit Crossingpoints nach einem LightCycler-Lauf mit 28 Ansätzen. Blau umrandet: Crossingpoints der einzelnen Ansätze. Pos.: Position des Ansatzes im Probenkarussell. Name: Name der Probe. Calculated Concentration: Hier jeweils Null, weil es sich um eine relative Quantifizierung handelt. Grouped means: Mittelwert der Duplikate einer Probe. Grouped S.D.: zugehörige Standardabweichung. Bei den Ansätzen 27 und 28 handelt es sich um die Negativ-Kontrollen. Die Fluoreszenz trat in diesen Ansätzen nicht aus dem Hintergrundsignal hervor.

4.1.2.5 Generierung einer Standardkurve für Ziel- und Haushaltsgene

Die Vorgehensweise bei der Erstellung einer Standardkurve wurde bereits im Methodenteil erläutert. Im Anschluss werden fünf Abbildungen (38, 39, 40, 41, 42) gezeigt, die jeweils eine Standardkurve eines der fünf Gene darstellt, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Entlang der Abszisse sind die logarithmierten Werte der verwendeten Konzentrationen angegeben. Auf der Ordinate sind die Werte des Crossingpoints jedes Ansatzes aufgetragen. Man kann erkennen, dass für jede Kurve sechs Verdünnungsstufen mit je zwei bis fünf Replikaten eingesetzt wurden. Auch bei den höheren Verdünnungsstufen liegen die Werte der Replikate sehr dicht beieinander.

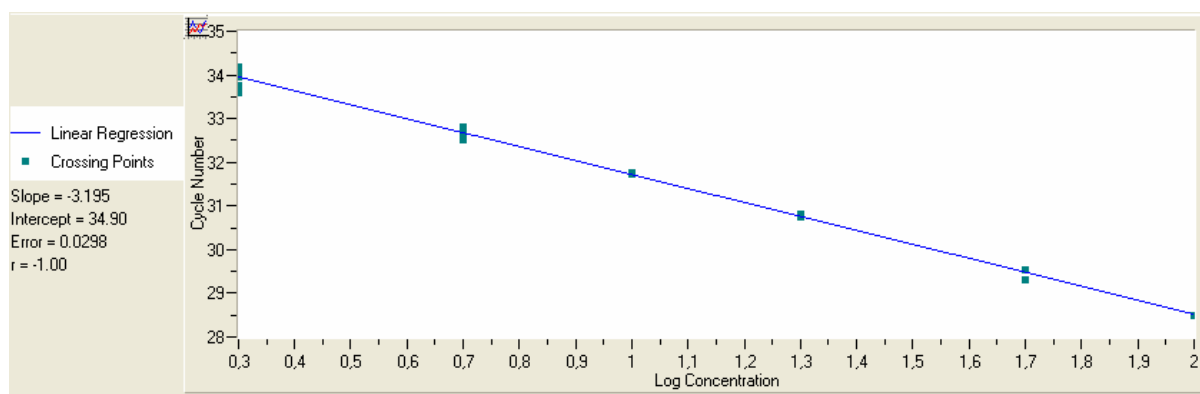


Abb. 38: Standardkurve des Gens *humanes Brain and Muscle ARNT-like (hBMAL1)*. Es wurden jeweils sechs verschiedene Calibrator-Verdünnungen als Matrize eingesetzt. Die eingezeichneten Punkte stellen die Crossing-Points des jeweiligen Ansatzes in den verschiedenen Verdünnungsstufen dar. Die anhand der Steigung der Geraden errechnete Effizienz dieser PCR liegt bei $E = 2,06$

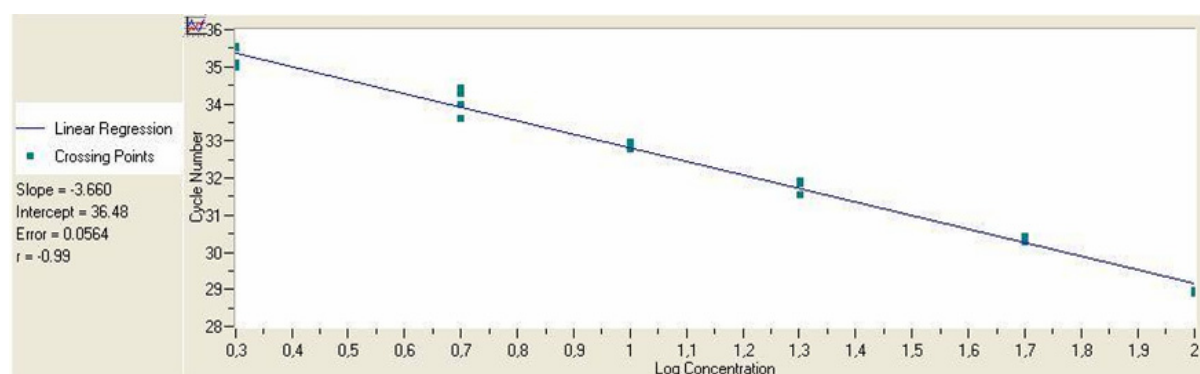


Abb. 39: Standardkurve des Gens *humanes Period Homolog 1 (hPER1)*. Es wurden jeweils sechs verschiedene Calibrator-Verdünnungen als Matrize eingesetzt. Die eingezeichneten Punkte stellen die Crossing-Points des jeweiligen Ansatzes in den verschiedenen Verdünnungsstufen dar. Die anhand der Steigung der Geraden errechnete Effizienz dieser PCR liegt bei $E = 1,88$

Ergebnisse

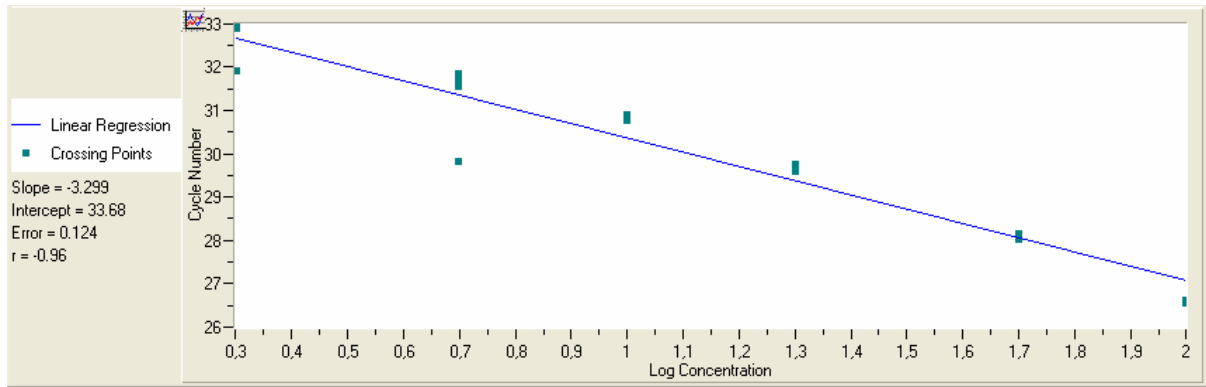


Abb. 40 Standardkurve des Gens *humanes Acidic Ribosomal Phosphoprotein P0 (h36B4)*. Es wurden jeweils sechs verschiedene Calibrator-Verdünnungen als Matrize eingesetzt. Die eingezeichneten Punkte stellen die Crossing-Points des jeweiligen Ansatzes in den verschiedenen Verdünnungsstufen dar. Die anhand der Steigung der Geraden errechnete Effizienz dieser PCR liegt bei $E = 2,01$

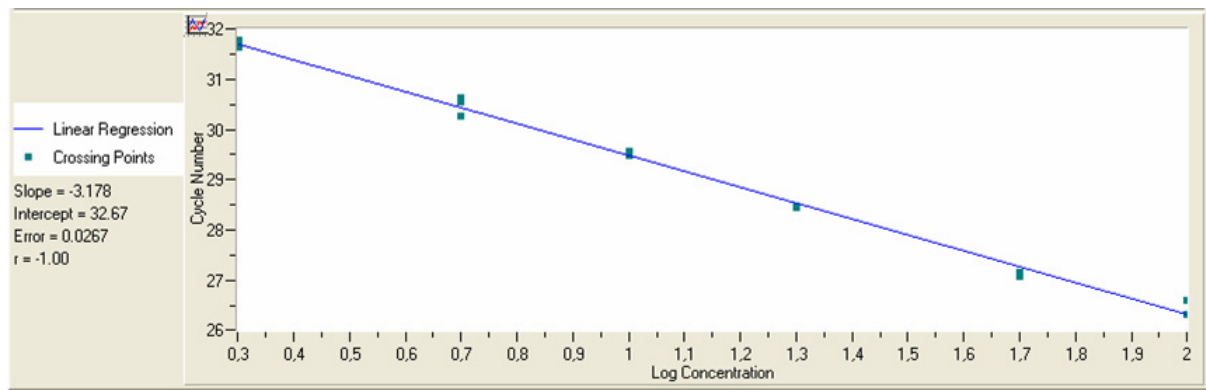


Abb. 41: Standardkurve des Gens *humane Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (hGAPDH)*. Es wurden jeweils sechs verschiedene Calibrator-Verdünnungen als Matrize eingesetzt. Die eingezeichneten Punkte stellen die Crossing-Points des jeweiligen Ansatzes in den verschiedenen Verdünnungsstufen dar. Die anhand der Steigung der Geraden errechnete Effizienz dieser PCR liegt bei $E = 2,06$

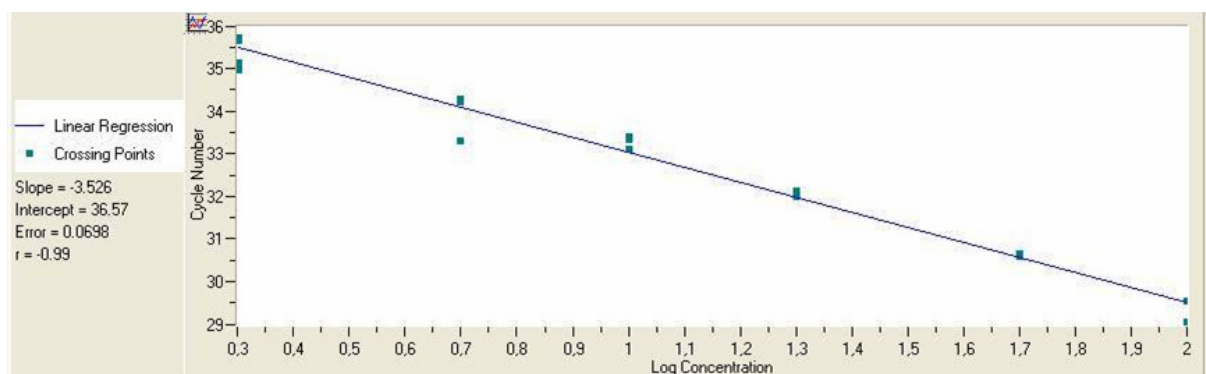


Abb. 42: Standardkurve des Gens *humane Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyl Transferase (hHPRT)*. Die eingezeichneten Punkte stellen die Crossing-Points des jeweiligen Ansatzes in den verschiedenen Verdünnungsstufen dar. Die anhand der Steigung der Geraden errechnete Effizienz dieser PCR liegt bei $E = 1,92$

4.1.2.6 Vergleich der Effizienzen von Zielgenen und Haushaltsgenen

Anhand der Steigung der Geraden, die in den Abbildungen 38 bis 42 unter „Slope“ angegeben ist, wurde die Effizienz der zugehörigen PCR errechnet. Die zugehörige Formel wurde bereits im Methodenteil erläutert.

Die Tabelle 15 stellt die errechneten PCR-Effizienzen für alle in dieser Arbeit untersuchten Gene dar. Die Werte liegen zwischen 1,88 (*hPER1*) und 2,06 (*hBMAL1*, *hGAPDH*). Damit liegen sie sehr nahe an dem Wert von 2,0. Dieser entspräche einem optimalen exponentiellen Wachstum, bei dem pro PCR-Zyklus die Anzahl der Amplifikate jeweils verdoppelt werden würde.

Tab. 15: PCR-Effizienzen von Echtzeit-PCRs für Ziel- und Haushaltsgene

Gen	PCR-Effizienz
<i>hBMAL1</i>	2,06
<i>hPER1</i>	1,88
<i>h36B4</i>	2,01
<i>hGAPDH</i>	2,06
<i>hHPRT</i>	1,92

4.1.2.7 Regulierung der Haushaltsgene

Für die Auswahl des verwendeten Haushaltsgens wurden drei verschiedene Gene in die engere Wahl gezogen. Hierbei handelte es sich um die Gene *h36B4*, *hGAPDH* und *hHPRT*. Für alle drei Gene wurden LightCycler®-Läufe etabliert. Schließlich wurde überprüft, ob die Gene unter den hier zu untersuchenden Bedingungen, d.h. Alter, Geschlecht und Tageszeit, reguliert waren. Hierzu wurden die Ratios aus den Haushaltsgenen und einem Zielgen von mehreren Personen gebildet, und miteinander verglichen. D.h. konkret, es wurden jeweils die Ratios *hPER1/h36B4*, *hPER1/hGAPDH* und *hPER1/hHPRT* von mehreren Probanden gebildet. Für das Kriterium Alter wurden die Ratios von jeweils zwei jüngeren Probandinnen und zwei älteren Probandinnen gegenübergestellt (Abb. 43). Die Proben waren alle zum selben Zeitpunkt (acht Uhr morgens) entnommen worden. Für das Kriterium Geschlecht wurden die Ratios von zwei älteren Frauen und zwei älteren Männern verwendet (Abb. 44). Für das Kriterium Unrzeit wurden die Ratios aus Proben verwendet, die um acht Uhr morgens und 20 Uhr abends gesammelt worden waren (Abb. 45). Hier wurden die Proben von drei Frauen und einem Mann verwendet. Die Vorgehensweise wird nachfolgend genauer beschrieben.

Wichtig für die Auswahl des Haushaltsgens ist es, dass mindestens zwei der Haushaltsgen-Ratios stets im etwa gleichen Verhältnis zueinander stehen. Dies wird als Beleg dafür angesehen, dass die Haushaltsgene unter den zu untersuchenden Gegebenheiten nicht reguliert werden.

Untersuchung der Regulierung im Rahmen von Alternsprozessen

Zunächst wurde überprüft, ob im Alter eine Regulierung der drei Haushaltsgene erfolgt. Hierzu wurde die Expression bei zwei jungen und zwei älteren Frauen vergleichend untersucht (Abb. 43). Wie zu erkennen ist, wird das Gen *h36B4* innerhalb der älteren Frauen stärker exprimiert als das Gen *hHPRT*, und dieses wiederum stärker als das Gen *hGAPDH*. Bei den jüngeren Frauen hingegen wird das Haushaltsgen *hHPRT* wesentlich stärker exprimiert als die beiden anderen Haushaltsgene, die auf einem etwa gleich hohen Niveau liegen. Damit kann für das Gen *hHPRT* nicht davon ausgegangen werden, dass es altersbezogen nicht reguliert wird. Deshalb scheidet es für diese Studie als Haushaltsgen aus.

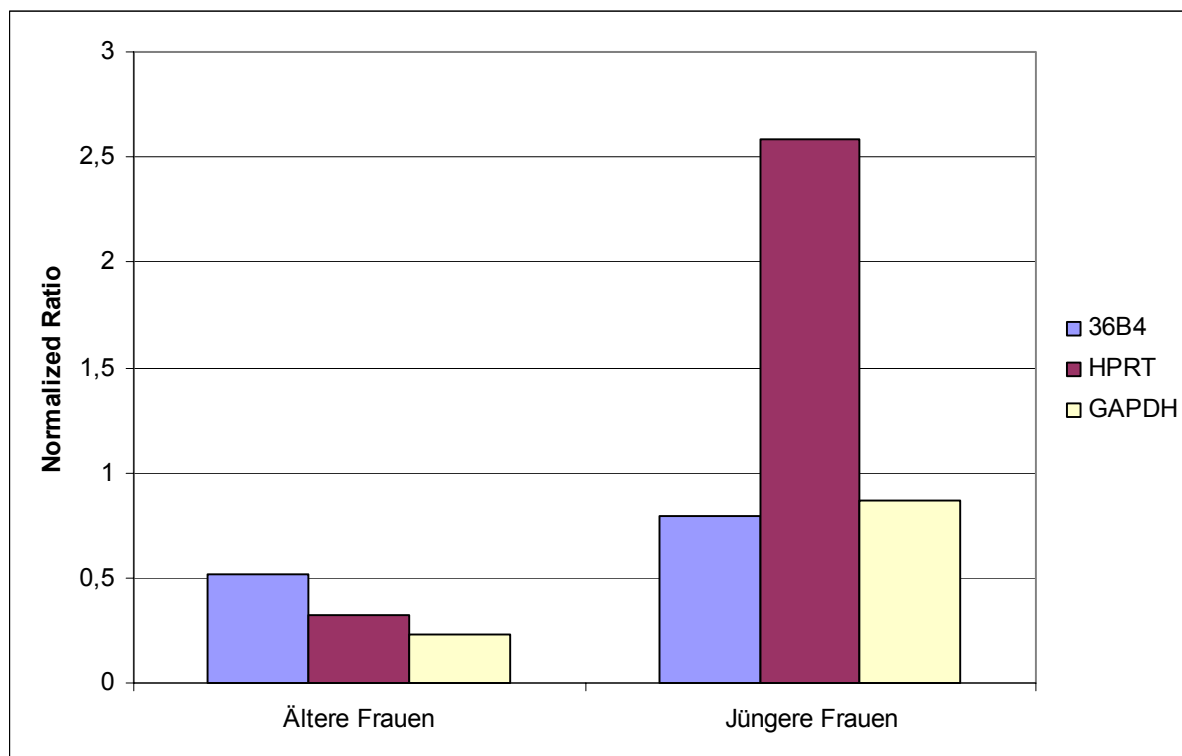


Abb. 43: Vergleich der Expression von drei Haushaltsgenen bei jüngeren und älteren Frauen. In die Abbildung eingeflossen sind jeweils die acht-Uhr-Werte von zwei jüngeren und zwei älteren Frauen, die nach dem Zufallsprinzip aus den Probandenkollektiven ausgewählt wurden.

Untersuchung der Regulierung im Rahmen von Geschlechtsunterschieden

Anschließend wurden die drei Haushaltsgene nach dem Kriterium Geschlecht auf Regulierung analysiert (Abb. 44). Die Untersuchung wurde auf ältere Probanden begrenzt. Sowohl bei Männern als auch bei Frauen wird das Haushaltsgen *h36B4* etwa doppelt so stark wie das Gen *hGAPDH* exprimiert. Die Verhältnisse sind also bei beiden Geschlechtern etwa gleich. Das Haushaltsgen *hHPRT* wird hingegen in der Gruppe der älteren Männer stärker als in der Gruppe der älteren Frauen exprimiert und fällt somit ebenfalls als Haushaltsgen für das untersuchte Kriterium Geschlecht aus. Dagegen können die Gene *h36B4* und *hGAPDH* als Haushaltsgen eingesetzt werden.

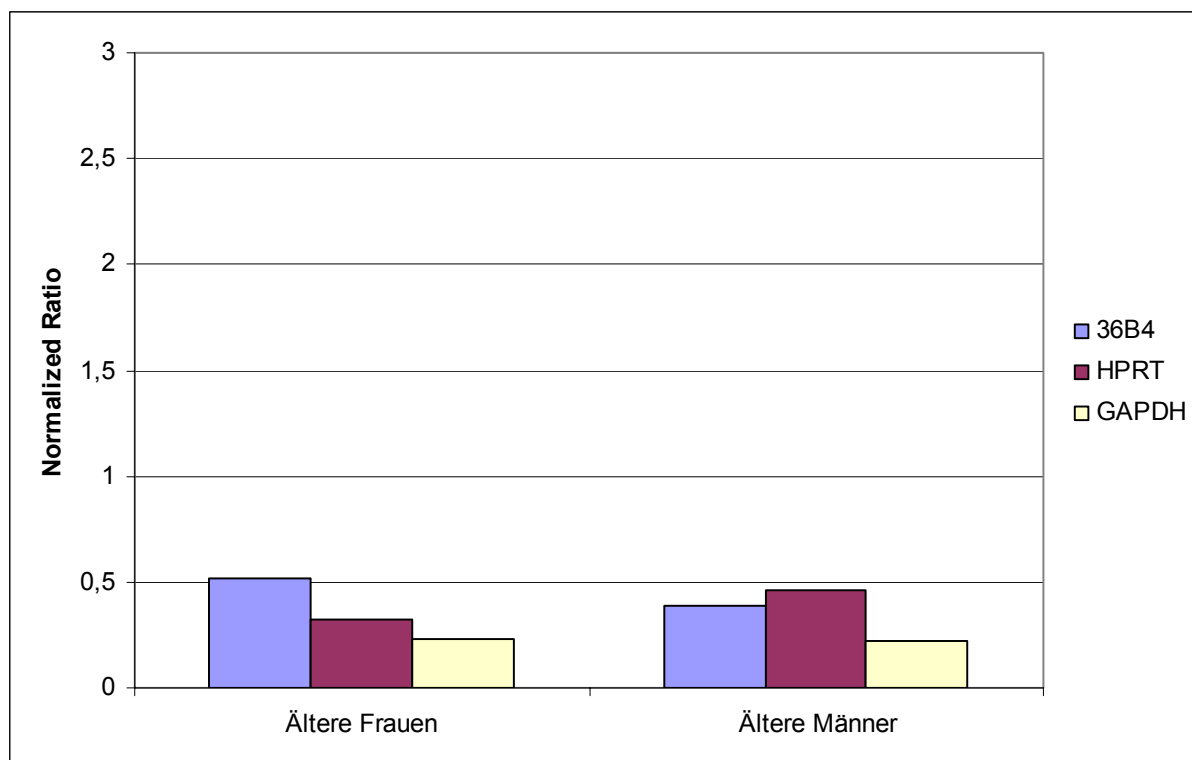


Abb. 44: Vergleich der Expression von drei Haushaltsgenen bei älteren Männern und älteren Frauen. In die Abbildung eingeflossen sind jeweils die acht-Uhr-Werte von zwei männlichen und zwei weiblichen, willkürlich aus dem Probandenkollektiv ausgewählten Personen.

Untersuchung der Regulierung nach Tageszeit

Als drittes und letztes Kriterium für eine Regulation von Haushaltsgenen wurde die Tageszeit der Probannahme überprüft. Da es sich bei den untersuchten Zielgenen um circadian exprimierte Gene handelt, würde die Regulation von Haushaltsgenen im Tagesverlauf zu ungenauen Ergebnissen bei der relativen Quantifizierung führen. Hier ergibt sich wiederum das Bild, dass das Haushaltsgen *h36B4* stärker exprimiert wird als das Gen *hGAPDH*. Sowohl um acht Uhr morgens als auch um 20 Uhr abends ist das Verhältnis der Expressionen jedoch in etwa gleich. Das Gen *hHPRT* wird zu beiden Uhrzeiten weniger

stark exprimiert als das Gen *h36B4*, aber stärker als das Gen *hGAPDH* (Abb. 45). Somit sind nach diesem Untersuchungskriterium alle drei Gene als Haushaltsgen geeignet.

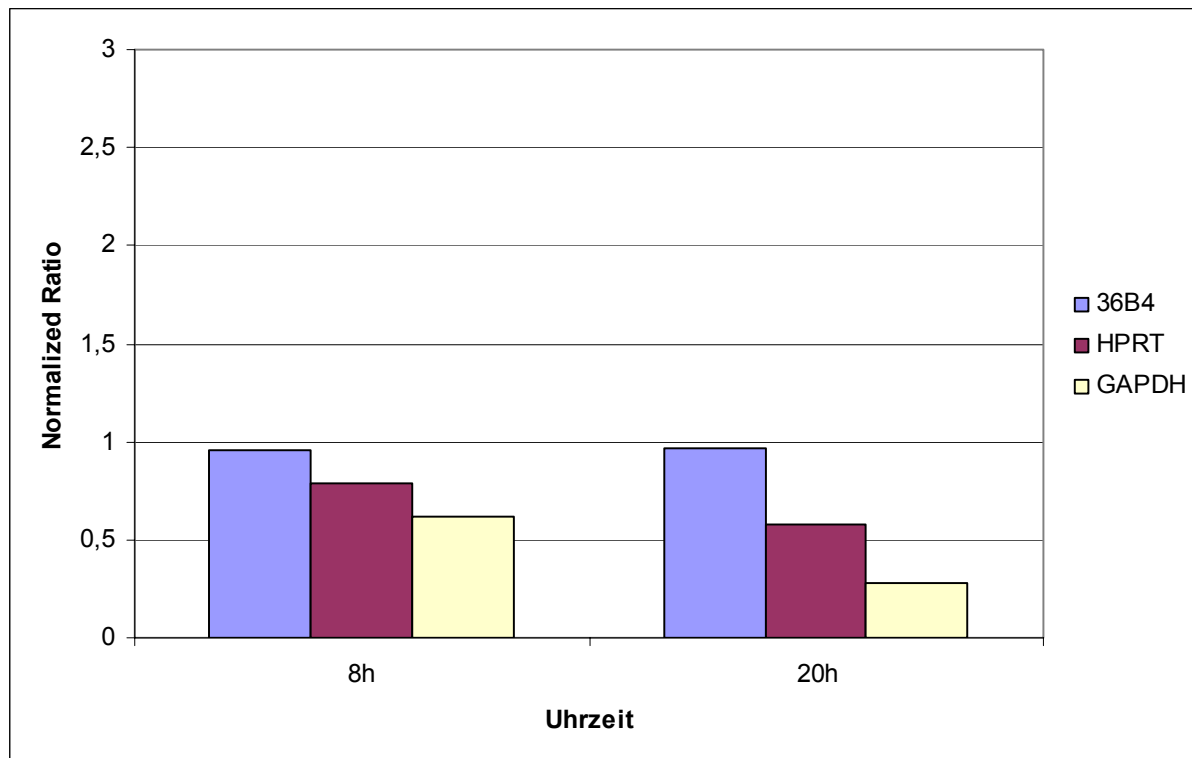


Abb. 45: Vergleich der Expression von drei Haushaltsgenen um acht Uhr und um 20 Uhr. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ratios von drei weiblichen und einem männlichen Probanden.

Die letztendliche Wahl fiel in dieser Studie aus zwei Gründen auf das Haushaltsgen *h36B4* als Standard in der quantitativen PCR. Erstens konnte gezeigt werden, dass es unter den Kriterien „Geschlecht“, „Alter“ und „Tageszeit“ nicht reguliert wird. Zweitens entsprach die Expressionsstärke des Gens *h36B4* eher der der Zielgene *hBMAL1* und *hPER1*, als es beim Haushaltsgen *hGAPDH* der Fall war.

4.1.2.8 Interassay-Vergleich zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Messergebnisse

Der Inter-Assay-Variationskoeffizient (CV) wurde errechnet, um die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse beurteilen zu können, die auf dem LightCycler ermittelt wurden. Hierzu wurde in drei Schritten vorgegangen:

1) Durchführung von Echtzeit-PCRs

Anhand von Proben die von drei jüngeren Frauen stammten, und die auch in diese Studie eingeflossen sind, wurden jeweils sechs Ansätze (8, 12, 16, 20, 22 und 24 Uhr) in zwei

Ergebnisse

getrennten Läufen für das Gen *hBMAL1* durchgeführt. Die Ratios wurden mit *h36B4* als Haushaltsgen ermittelt, und finden sich in Tabelle 16.

Tab. 16: Vergleich der Ratios von *hBMAL1/h36B4* zwischen zwei PCR-Läufen von drei Probandinnen mit jeweils sechs Proben

Prob.-Nr.	Uhrzeit (Std)	Gene	Ratio erster Lauf	Ratio zweiter Lauf
DO-25	8	<i>hBMAL1/h36B4</i>	0,18	0,18
DO-25	12	<i>hBMAL1/h36B4</i>	0,27	0,25
DO-25	16	<i>hBMAL1/h36B4</i>	0,21	0,13
DO-25	20	<i>hBMAL1/h36B4</i>	0,14	0,17
DO-25	22	<i>hBMAL1/h36B4</i>	0,23	0,20
DO-25	24	<i>hBMAL1/h36B4</i>	0,09	0,10
DO-28	8	<i>hBMAL1/h36B4</i>	0,04	0,04
DO-28	12	<i>hBMAL1/h36B4</i>	0,14	0,08
DO-28	16	<i>hBMAL1/h36B4</i>	0,10	0,07
DO-28	20	<i>hBMAL1/h36B4</i>	0,09	0,08
DO-28	22	<i>hBMAL1/h36B4</i>	0,11	0,08
DO-28	24	<i>hBMAL1/h36B4</i>	0,05	0,04
DO-30	8	<i>hBMAL1/h36B4</i>	0,09	0,06
DO-30	12	<i>hBMAL1/h36B4</i>	0,05	0,05
DO-30	16	<i>hBMAL1/h36B4</i>	0,13	0,12
DO-30	20	<i>hBMAL1/h36B4</i>	0,26	0,17
DO-30	22	<i>hBMAL1/h36B4</i>	0,16	0,11
DO-30	24	<i>hBMAL1/h36B4</i>	0,21	0,25

2) Errechnen von Variationskoeffizienten

Zunächst wurden die Variationskoeffizienten zwischen jeweils erstem Lauf und zweitem Lauf für jede Uhrzeit eines Probanden errechnet. Der Variationskoeffizient hat die Einheit Prozent und wurde mit folgender Formel berechnet:

$$CV = \frac{\text{Standardabweichung SD}}{\text{Mittelwert}} \times 100$$

3) Errechnen des mittleren Variationskoeffizienten

Abschließend wurden die Variationskoeffizienten nach Uhrzeit unterteilt über die Werte der drei Probanden gemittelt. So entsteht für jede Uhrzeit ein Variationskoeffizient, der ein Maß

für die Reproduzierbarkeit der hier durchgeführten PCRs auf dem LightCycler ist. Die Werte finden sich in Tabelle 17.

Tab. 17: Übersicht über die fünf mittleren Variationskoeffizienten der Ratios von *hBMAL1/h36B4* für sechs verschiedene Zeitpunkte

Ratio	Uhrzeit (Std)	N	Mittlerer Variationskoeffizient (%)
<i>hBMAL1/h36B4</i>	8	3	9,4
<i>hBMAL1/h36B4</i>	12	3	14,7
<i>hBMAL1/h36B4</i>	16	3	21,3
<i>hBMAL1/h36B4</i>	20	3	17,2
<i>hBMAL1/h36B4</i>	22	3	19,5
<i>hBMAL1/h36B4</i>	24	3	11,8

4.2 Deskriptive Merkmale der Probanden

Im nachfolgenden Teil dieser Arbeit soll das Probandenkollektiv zunächst allgemein beschrieben werden.

4.2.1 Allgemeine Kennzeichen

Nachfolgend werden die Kennzeichen der Probanden erläutert, die mit Hilfe des allgemeinen Fragebogens erfasst wurden, oder durch Messung in der Abteilung für Humanbiologie ermittelt wurden.

Anzahl und Alter der Probanden

An dieser Studie nahmen insgesamt 44 Probanden teil. Hiervon waren 20 weiblich und älter als 60 Jahre ($67,90 \pm 5,12$ Jahre), zehn weiblich und im Alter von 23 bis 28 Jahren ($25,70 \pm 1,83$ Jahre), und 14 älter als 60 Jahre ($68,29 \pm 2,96$ Jahre) und männlich (Tab. 18).

Tab. 18: Anzahl und mittleres Alter der Studienteilnehmer

	N	Alter (Jahre)			
		M	S	Min.	Max.
Ältere Männer	14	68,29	2,95	63	74
Ältere Frauen	20	67,90	5,12	60	82
Jüngere Frauen	10	25,70	1,83	23	28

M= Mittelwert; S = Standardabweichung; Min. = Minimalwert; Max. = Maximalwert

Anthropometrische Merkmale

Zu den anthropometrischen Merkmalen der Probanden (Tab.19) ist festzuhalten, dass die männlichen Probanden sowohl bei der mittleren Körperhöhe ($176,93 \pm 6,18$ cm) als auch bei dem mittleren Körpergewicht ($84,46 \pm 8,85$ kg) und dem von diesen beiden Variablen abhängigen BMI ($27,05 \pm 3,15$ kg/m²) von allen drei Gruppen die höchsten Werte aufweisen. Bei den jüngeren Frauen sind die Mittelwerte von Körperhöhe ($174,14 \pm 6,68$ cm) und Körpergewicht ($69,25 \pm 10,32$ kg) jeweils höher als bei den älteren Frauen ($163,72 \pm 5,35$ cm bzw. $69,25 \pm 10,32$ kg). Der BMI der älteren Probandinnen ist jedoch im Mittel um ein kg/m² höher als der Wert der jüngeren Frauen.

Tab. 19: Anthropometrische Merkmale der Probanden

	N	Körperhöhe (cm)		Körpergewicht (kg)		BMI (kg/m ²)	
		M	S	M	S	M	S
Ältere Männer	14	176,93	6,18	84,46	8,85	27,05	3,15
Ältere Frauen	20	163,72	5,35	69,25	10,32	25,82	3,49
Jüngere Frauen	10	174,14	6,68	75,61	13,63	24,85	3,65

BMI= Body Mass Index; M=Mittelwert; S=Standardabweichung

Die Wohnsituation der Probanden

Die Wohnsituation der Probanden (Tab. 20) weist ebenfalls deutliche Unterschiede auf. Während innerhalb der männlichen Probandengruppe ein Großteil (78%) mit einer anderen Person zusammen lebt, kommt dies bei den jüngeren Frauen (60%) und den älteren Frauen (35%) nur seltener vor.

Tab. 20: Wohnsituation der Studienteilnehmer

	N	Alleine lebend	Zusammen lebend
Ältere Männer	14	3	11
Ältere Frauen	20	13	7
Jüngere Frauen	10	4	6

Die Beschäftigungssituation der Probanden

An der Beschäftigungssituation der Probanden (Tab. 21) ist zunächst auffällig, dass es sich nur bei zwei Personen des 44 Probanden umfassenden Kollektivs um Hausfrauen handelt. Beide sind innerhalb der älteren weiblichen Probandinnen zu finden. Die verbleibenden 42 Studienteilnehmer sind entweder als Student eingeschrieben, berufstätig bzw. selbständig, oder waren dies zumindest, bevor sie in den Ruhestand eingetreten sind. Betrachtet man

hier die prozentualen Anteile, so werden wiederum Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Probanden deutlich. In der Gruppe der älteren Männer sind 12 der 14 Probanden bereits im Ruhestand. Dies entspricht 85,7%. Bei den älteren Frauen sind 13 von 20, und somit 65% im Ruhestand, 25% noch berufstätig oder selbständig, und 2/10 Hausfrauen. Von den zehn jüngeren Probandinnen sind 9/10 berufstätig oder als Studentin eingeschrieben, eine jüngere Probandin war arbeitssuchend.

Tab. 21: Beschäftigungssituation der Probanden

	N	Hausmann/-frau	Berufstätig/selbständig oder Student	Ruheständler oder arbeitssuchend
Ältere Männer	14	0	2	12
Ältere Frauen	20	2	5	13
Jüngere Frauen	10	0	9	1

Selbsteinschätzung des Gesundheitszustandes

Die Tabelle 22 gibt wieder, wie die Studienteilnehmer ihren eigenen Gesundheitszustand im Vergleich zu Gleichaltrigen einschätzten. Die Skala reichte hier in fünf Abstufungen von „sehr schlecht“ bis hin zu „sehr gut“. Die überwältigende Mehrheit der Probanden gab ihren eigenen Gesundheitszustand im Vergleich zu Altersgenossen mit mittel bis sehr gut an. Nur eine Probandin schätzte ihn als vergleichsweise „sehr schlecht“ ein. Auch hier gab es keinen größeren Unterschied zwischen den älteren Frauen und Männern. In beiden Gruppen hielt der Großteil (etwa 70%) den eigenen Gesundheitszustand für vergleichsweise gut. In der jüngeren Frauengruppe hielt ein wesentlich höherer Anteil (40%) die eigene Gesundheit sogar für „sehr gut“ im Vergleich zu Gleichaltrigen.

Tab. 22: Selbstbeurteilung des Gesundheitszustands der Probanden

	N	Gesundheitszustand				
		Sehr schlecht	Schlecht	Mittel	Gut	Sehr gut
Ältere Männer	14	0	0	3	10	1
Ältere Frauen	20	1	0	2	14	3
Jüngere Frauen	10	0	0	2	4	4

Das Rauchverhalten der Probanden

Obwohl das Rauchverhalten der Probanden kein Auswahlkriterium war, gab es nur eine einzige weibliche Probandin, die Raucherin war (Tab. 23). Damit handelte es sich bei 97,7% des Probandenkollektivs um Nichtraucher.

Tab. 23: Das Rauchverhalten der Probanden

	N	Raucher: ja	Raucher: nein
Ältere Männer	14	0	14
Ältere Frauen	20	1	19
Jüngere Frauen	10	0	10

Konsum von Kaffee, Tee und Alkohol

In Tabelle 24 dargestellt ist der mittlere wöchentliche Genuss von Kaffee/ schwarzem oder grünem Tee sowie Alkohol der Probanden.

Tab. 24: Wöchentlicher Kaffee-/Tee- und Alkoholgenuss der Studienteilnehmer

	N	Kaffee/schwarzer Tee/ grüner Tee (Tassen/Woche)		Alkohol (Gläser/Woche)	
		M	S	M	S
Ältere Männer	14	22,07	10,78	4,93	4,20
Ältere Frauen	20	23,73	12,80	3,18	2,94
Jüngere Frauen	10	9,85	10,92	2,06	1,77

M=Mittelwert; S=Standardabweichung

Hier fällt besonders der große Unterschied im Kaffee- bzw. Teegenuss zwischen jüngeren und älteren Probanden ins Auge. Während in den älteren Probandengruppen im Mittel 22,07 bzw. 23,73 Tassen Kaffee bzw. schwarzer oder grüner Tee pro Woche getrunken wurden, wurde von den jungen Frauen im Mittel weniger als die Hälfte, 9,85 Tassen wöchentlich, konsumiert. Die jeweils zugehörige Standardabweichung ist relativ hoch, was auf eine breite Streuung innerhalb der Werte hindeutet.

Der Alkoholkonsum der älteren Männer beträgt im Mittel 4,93 Gläser pro Woche. Dies ist mehr als das Doppelte des Konsums von jungen Frauen, der im Mittel bei 2,06 Gläsern pro Woche liegt (vgl. Tab. 24). Zieht man die älteren Probandinnen hinzu, ergibt sich eine graduelle Abstufung der Gruppen Ältere Männer - Ältere Frauen - Jüngere Frauen. Auch in diesem Punkt ist die Standardabweichung, gerade in der Gruppe der älteren Männer, relativ hoch. Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant.

Medikamenteneinnahme und Einnahme von Hormonpräparaten

In Tabelle 25 ist nach Gruppen aufgeteilt dargestellt, wieviele der Personen, die an dieser Studie teilgenommen haben, Medikamente einnahmen. In der Gruppe der jüngeren Frauen nahm niemand Medikamente ein. Hierbei wurden orale Kontrazeptiva nicht als Medikament

gewertet, weil sie nicht der Behandlung einer Krankheit dienen. In der Gruppe der älteren Frauen nahmen 16 Personen Medikamente ein, was 80% entspricht. In der Gruppe der älteren Männer fand Medikamenteneinnahme bei neun von 14 Individuen (64,3%), statt. Somit werden in der Gruppe der über 60-Jährigen von wesentlich mehr als der Hälfte Medikamente benötigt.

Tab. 25: Medikamenteneinnahme der Probanden

	N	Medikamenteneinnahme:ja	Medikamenteneinnahme: nein
Ältere Männer	14	9	5
Ältere Frauen	20	16	4
Jüngere Frauen	10	0	10

Die Tabelle 26 gibt wieder, wieviele der Probandinnen sich im Rahmen ihres Klimakteriums einer Hormonersatztherapie unterzogen bzw. wie viele von ihnen orale Kontrazeptiva einnahmen. Ein Großteil (90%) der älteren Frauen unterzog sich keiner Hormonersatztherapie, aber 4/10 jüngeren Probandinnen nahmen orale Kontrazeptiva ein.

Tab. 26: Hormonersatztherapie und Einnahme von oralen Kontrazeptiva der Probandinnen

	N	Hormonersatztherapie		orale Kontrazeptiva	
		ja	nein	ja	nein
Ältere Frauen	20	2	18	0	20
Jüngere Frauen	10	0	10	6	4

Aufenthalt im Freien

Auch die Frage, wieviel Zeit die Probanden im Mittel im Freien verbringen, wurde ihnen gestellt. Hierbei stellte sich eine graduelle Abstufung heraus (Tab. 27). Die älteren Männer verbrachten im Mittel $5,21 \pm 3,77$ Stunden im Freien. Dieser Wert liegt etwa 1,5 Stunden höher als der der älteren Frauen ($3,95 \pm 2,74$ Std). Die älteren Frauen wiederum verbringen im Mittel 0,85 Stunden mehr im Freien als die jüngeren Frauen ($3,10 \pm 1,54$ Std).

Tab. 27: Zeit, die im Mittel von den Probanden im Freien verbracht wird

	N	Zeit im Freien (Std)	
		M	S
Ältere Männer	14	5,21	3,77
Ältere Frauen	20	3,95	2,74
Jüngere Frauen	10	3,10	1,54

M=Mittelwert; S=Standardabweichung

4.2.2 Körperliche Aktivität

Vergleicht man die mittleren METs, die mit Hilfe des Freiburger Fragebogens in den verschiedenen Probandengruppen ermittelt wurden, so fallen folgende Punkte auf. Die Gesamtaktivitäten von älteren Männern und älteren Frauen liegen mit 80,57 bzw. 82,65 METs dicht beieinander, sind jedoch wesentlich höher als die mittleren METs der jüngeren Probandinnen mit einem mittleren Gesamtwert von 33,28 METs (Tab. 28).

Tab. 28: Verteilung der körperlichen Aktivität der Probanden

	N	Basisaktivitäten (METs)		Freizeitaktivitäten (METs)		Sport (METs)		Gesamtaktivität (METs)	
		M	S	M	S	M	S	M	S
Ältere Männer	14	47,20	54,67	23,53	36,50	9,85	10,89	80,57	66,55
Ältere Frauen	20	29,09	31,32	32,39	33,29	21,12	21,62	82,65	51,03
Jüngere Frauen	10	9,67	9,75	11,28	20,96	12,34	11,85	33,28	27,11

METs = Metabolische Äquivalente; M = Mittelwert; S = Standardabweichung

Des Weiteren ist auch die anteilige Verteilung der MET-Zahlen auf die drei Bereiche Basisaktivitäten, Freizeitaktivitäten und Sport jeweils unterschiedlich. In der Gruppe der älteren Männer machen die Basisaktivitäten mit 47,20 METs mehr als die Hälfte der Gesamt-MET-Zahl aus. Freizeitaktivitäten und Sport folgen mit 23,53 METs und 9,85 METs. Bei den älteren Probandinnen haben die Freizeitaktivitäten mit 32,39 METs den höchsten Anteil an der Gesamt-MET-Zahl. Darauf folgen Basisaktivitäten mit 29,09 METs und schließlich der Sport mit 21,12 METs. Bei den jüngeren Probandinnen ist der höchste MET-Wert mit 12,34 beim Sport zu finden. Darauf folgen die Freizeitaktivitäten mit 11,28 METs, und die Basisaktivitäten machen mit 9,67 METs den geringsten Anteil der Gesamt-Punktsumme aus (Tab. 28). Die MET-Verteilung in der Gruppe der jüngeren Frauen entspricht keiner der älteren Probandengruppen. Hier sind Sport- und Freizeitaktivitäten im Mittel fast gleich auf (12,34 bzw. 11,28 METs), und machen jeweils etwas mehr als ein Drittel der Gesamtaktivität aus, so dass in dieser Gruppe die Basisaktivitäten weniger als ein Drittel ausmachen.

Sämtliche Werte der jüngeren Probandinnen sind niedriger als die Werte der älteren Probanden.

4.2.3 Chronotypen-Verteilung

Wie Tabelle 29 zeigt, trat in der Gruppe der älteren Männer laut Fragebogenbefund zwei mal (14,3%) der Mischtyp und 12 mal (85,7%) der Frühtyp auf. Es gab keine Spättypen. In der Gruppe der älteren Frauen traten Misch- und Spättyp dreimal (je 15%) auf. Der Frühtyp kam in der Gruppe der älteren weiblichen Probandinnen 14 mal (70%) vor, und stellte damit den überwiegenden Teil dieser Gruppe. Bei den jüngeren Frauen kam der Mischtyp sechs mal (60%) vor, drei der Probandinnen (30%) erwiesen sich als Frühtyp und eine als Spättyp (10%). Insgesamt kam also der Frühtyp am häufigsten vor und trat bei 65,9% der Probanden auf. Der Mischtyp fand sich bei 25% aller Probanden und der Spättyp bei 9,1% des Probandenkollektivs.

Tab. 29: Chronotypen-Verteilung der Probanden nach Fragebogenbefund

	N	Frühtyp	Mischtyp	Spättyp
Ältere Männer	14	12	2	0
Ältere Frauen	20	14	3	3
Jüngere Frauen	10	3	6	1

Die Gruppen der Früh- und Spättypen lassen sich weiter untergliedern in definitive (extreme) und moderate Typen. Tabelle 30 zeigt, wie häufig die jeweiligen Typen innerhalb der Probandengruppen auftraten. So sieht man, dass es sich bei fünf (11,4%) der 44 teilnehmenden Probanden um Extremtypen handelte. Keiner davon stellte sich als definitiver Spättyp heraus, sondern es handelte sich jeweils um definitive Frühtypen. Zwei der Extremtypen zählten zu den männlichen Probanden, drei gehörten der älteren weiblichen Probandengruppe an. Keine der jüngeren Probandinnen stellte einen Extremtyp dar.

Tab. 30: Chronobiologische Extremtypen nach Fragebogenauswertung

	N	Frühtyp		Spättyp	
		Definitiv	Moderat	Definitiv	Moderat
Ältere Männer	12	2	10	0	0
Ältere Frauen	17	3	11	0	3
Jüngere Frauen	4	0	3	0	1

4.2.4 Schlafqualität

Die Auswertung des PSQI-Fragebogens ergab, dass in der Gruppe der älteren weiblichen Probanden neun gute und elf schlechte Schläferinnen zu verzeichnen waren (Tab. 31). Damit wurden in der Gruppe der älteren Probandinnen mehr als die Hälfte (55%) als schlechte Schläferinnen identifiziert. Bei den älteren Männern gab es dagegen nur etwa ein Drittel (35,7%) schlechte Schläfer. Alle jüngeren Probandinnen wiesen eine gute Schlafqualität auf.

Tab. 31: Aufteilung der Probanden in gute und schlechte Schläfer

	N	Anzahl gute Schläfer	Anzahl schlechte Schläfer
Ältere Männer	14	9	5
Ältere Frauen	20	9	11
Jüngere Frauen	10	10	0

Betrachtet man einzelne Variablen des PSQI-Fragebogens nach Gruppen unterteilt (Tab. 32), so ergaben sich weitere Unterschiede zwischen den Gruppen.

Frage sechs des Fragebogens zielt auf die subjektive Schlafqualität der Probanden ab. Die älteren Männer und die jüngeren Frauen erreichen hier im Mittel Punktwerte von $1,93 \pm 0,62$ bzw. $1,80 \pm 0,42$. Dies entspricht einer Einschätzung des eigenen Schlafes von „ziemlich gut“ mit Tendenz zu „sehr gut“. Anders bei den älteren Frauen. Diese erreichten im Mittel $2,35 \pm 0,75$ Punkte, was einer Selbsteinschätzung von „ziemlich gut“ bis „ziemlich schlecht“ entspricht. Im Mittel schätzten ältere Frauen ihre Schlafqualität subjektiv also schlechter ein, als die älteren Männer und die jüngeren Frauen. Dies wird auch objektiv durch die Fragebogenauswertung (s.o.) bestätigt. Die Dauer der Einschlafzeit deutet ebenfalls darauf hin, dass die älteren Probandinnen die größten Schlafprobleme haben. Sie benötigen im Mittel $23,80 \pm 26,87$ Minuten, um einzuschlafen. Dies ist deutlich länger als bei den älteren Männern ($18,29 \pm 29,64$ min.) oder jüngeren Frauen ($16,40 \pm 16,64$ min.). Was die Schlafdauer sowie die Zubettgehzeit betrifft, liegen die beiden älteren Probandengruppen jedoch dicht beieinander. Sie gingen jeweils gegen 23 Uhr ($1370,36 \pm 78,85$ min. bzw. $1386,75 \pm 44,20$ min.) ins Bett. Die jüngeren Probandinnen hingegen gingen erst etwa eine Stunde später, also gegen 24 Uhr ($1414,50 \pm 99,01$ min.) schlafen. Allerdings standen sie auch erst etwa eine Stunde später, nämlich etwa kurz nach acht Uhr morgens ($483,00 \pm 98,44$ min.) auf, als die älteren Probanden, die bereits kurz vor sieben Uhr ($415,71 \pm 39,22$ min. bzw. $418,75 \pm 62,83$ min) aufstanden. Dementsprechend unterscheidet sich die Liegedauer der Probandengruppen um maximal etwa 36 Minuten, nämlich zwischen den beiden Frauengruppen. Aufgrund der unterschiedlich langen Einschlafdauern ist der

Unterschied der Schlafdauer jedoch größer, und beträgt zwischen jüngeren und älteren Frauen 44 Minuten.

Tab. 32: Schlafmerkmale der Studienteilnehmer nach Fragebogenauswertung

	Ältere Männer (N=14)		Ältere Frauen (N=20)		Jüngere Frauen (N=10)	
	M	S	M	S	M	S
Schlafqualität (Punkte)	5,14	2,74	6,90	3,70	3,90	1,10
Schlafdauer (min)	467,07	86,88	447,50	53,36	491,50	59,34
Zubettgehzeit (min)	1370,36	78,85	1386,75	44,20	1414,50	99,01
Einschlafzeit (min)	18,29	29,64	23,80	26,87	16,40	16,64
Aufstehzeit (min)	415,71	39,22	418,75	62,83	483,00	98,44
Liegedauer (min)	485,36	86,99	471,30	53,61	507,90	56,61
Subjektive Schlafqualität (Punkte)	1,93	0,62	2,35	0,75	1,80	0,42

M = Mittelwert; S = Standardabweichung

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der größte Schlaf-Unterschied zwischen jüngeren und älteren Frauen beobachtet wurde. Obwohl die Zeit, die die Probandinnen im Bett verbringen etwa die gleiche ist, schlafen die jüngeren Frauen länger und besser.

4.2.5 Tagesschläfrigkeit

Anhand von Tabelle 33 soll die Neigung der Probanden zur Tagesschläfrigkeit erläutert werden. Betrachtet man zunächst die mittleren erreichten ESS-Punkte, so sieht man, dass eine Abstufung um jeweils etwa zwei Punkte vorliegt. Die älteren Männer haben im Mittel einen Punktwert von 9,07 erreicht, die jüngeren Frauen 7,40 Punkte, und die älteren Frauen erreichten einen Mittelwert von 5,65 Punkten. Dies bedeutet, dass die männlichen Probanden am stärksten zur Tagesschläfrigkeit neigen, und die älteren Frauen am wenigsten. Dies wird bestätigt durch die ebenfalls dargestellten absoluten Zahlen. So sind fünf der älteren Männer von Tagesschläfrigkeit betroffen (35,75%) was ein gutes Drittel ist. Bei neun von ihnen (64,3%) konnte hingegen keine Tagesschläfrigkeit festgestellt werden. Die älteren Frauen stellen die Gruppe mit der geringsten Tagesschläfrigkeit dar. Sowohl bei der mittleren Punktzahl, als auch bei der absoluten Zahl der betroffenen Personen zeigen sie die niedrigsten Werte. So leiden zwei ältere Probandinnen unter Tagesschläfrigkeit, aber 18 (90%) von ihnen nicht. Bei den jüngeren Frauen besteht ein Verhältnis von vier zu sechs zugunsten der Probandinnen ohne Tagesschläfrigkeit. Damit liegen die Werte zwischen

denen der beiden älteren Probandengruppen. Insgesamt weisen elf Probanden, also ein Viertel, Tagesschläfrigkeit auf.

Tab. 33: Die Tagesschläfrigkeit der Probanden

	N	ESS-Punkte		Tagesschläfrigkeit	Keine Tagesschläfrigkeit
		M	S		
Ältere Männer	14	9,07	3,58	5	9
Ältere Frauen	20	5,65	2,72	2	18
Jüngere Frauen	10	7,40	4,60	4	6

ESS = Epworth Sleepiness-Scale: M = Mittelwert; S = Standardabweichung

4.2.6 Jahreszeitliche Depression

Wie die Tabelle 34 zeigt, wurde bei insgesamt zehn Probanden eine jahreszeitliche Depression festgestellt. Dies betraf am häufigsten ältere Frauen (30%), gefolgt von jüngeren Frauen (2/10) und älteren Männern (14,3%)

Tab. 34: Anzahl der Probanden mit bzw. ohne jahreszeitliche Depression (SAD)

	N	SAD	Keine SAD
Ältere Männer	14	2	12
Ältere Frauen	20	6	14
Jüngere Frauen	10	2	8

4.2.7 Körperkerntemperatur-Profile

Tabelle 35 zeigt die mittleren Körperkerntemperaturwerte der Probanden im zeitlichen Verlauf von acht Uhr morgens bis 24 Uhr. Der niedrigste Wert findet sich mit $35,74 \pm 0,62^\circ\text{C}$ bei den männlichen älteren Probanden um acht Uhr. Die älteren weiblichen Probandinnen erreichen zur selben Uhrzeit bereits eine Körperkerntemperatur von $36,05 \pm 0,39^\circ\text{C}$, und liegen damit fast gleich auf mit den jüngeren Probandinnen. Sowohl jüngere als auch ältere weibliche Probandinnen zeigen um 24 Uhr die niedrigste Körperkerntemperatur. Die Gruppe der jüngeren weiblichen Probandinnen ist die einzige Gruppe, in der die $36,0^\circ\text{C}$ nicht unterschritten werden. Die höchsten Körperkerntemperatur-Werte werden in allen drei Gruppen in den Abendstunden erreicht. Ältere Männer und jüngere Frauen erreichen jeweils um 20 Uhr ihren Maximalwert von $36,35 \pm 0,27^\circ\text{C}$ bzw. $36,67 \pm 0,31^\circ\text{C}$. Letztgenannter Wert ist auch der insgesamt höchste Wert. Bei den älteren Frauen wird der maximale Wert etwas früher, um 19 Uhr, erreicht. Die Körperkerntemperatur-Kurve der älteren Männer verläuft bis auf wenige Ausnahmen unter derjenigen der älteren Frauen, und diese wiederum unterhalb

derjenigen der jüngeren Frauen. Die grundsätzliche Verlaufsform ist jedoch in allen drei Fällen sehr ähnlich. Nach einem deutlichen Anstieg am Vormittag von acht Uhr bis zwölf Uhr steigt die Kurve kaum noch an. Sie steigt wieder bis etwa 17 Uhr, um 18 Uhr erfolgt ein kurzes Absinken der Kurve, und kurz darauf wird das Maximum am Abend erreicht. Ab dann folgt wiederum ein kontinuierliches Absinken der Körperkerntemperatur bis zum Messzeit-Ende um 24 Uhr.

Tab. 35: Verlauf der Körperkerntemperatur in drei Probandengruppen über 16 Stunden

Uhrzeit (Std)	Körperkerntemperatur (°C)					
	Ältere Männer (N= 14)		Ältere Frauen (N=20)		Jüngere Frauen (N=10)	
	M	S	M	S	M	S
08:00	35,74	0,62	36,05	0,39	36,08	0,48
12:00	36,16	0,43	36,15	0,46	36,36	0,33
16:00	36,19	0,56	36,37	0,39	36,44	0,35
17:00	36,31	0,37	36,58	0,25	36,57	0,27
18:00	36,30	0,35	36,47	0,23	36,54	0,30
19:00	36,33	0,37	36,53	0,19	36,63	0,26
20:00	36,35	0,27	36,41	0,25	36,67	0,31
21:00	36,20	0,26	36,26	0,30	36,49	0,29
22:00	36,08	0,25	36,12	0,32	36,37	0,28
23:00	35,99	0,32	35,95	0,26	36,29	0,28
24:00	35,88	0,32	35,88	0,31	36,25	0,32
Mittlere Temperatur:	36,18	0,26	36,27	0,19	36,47	0,26
Temperatur- Unterschied:	0,61		0,70		0,42	

M=Mittelwert; S=Standardabweichung

4.2.8 Cortisol-Morgenprofile und CAR

Cortisol-Aufwachkonzentration

Die Cortisol-Aufwach-Konzentration entspricht der Konzentration, die in der Speichelprobe gemessen wurde, die die Probanden direkt nach dem Erwachen gesammelt haben. Sie unterscheidet sich innerhalb der beiden älteren Probandengruppen kaum. Dagegen ist die Cortisol-Konzentration bei jüngeren Frauen deutlich höher (Tab. 36).

Tab. 36: Mittelwerte und Standardabweichungen für das Cortisol-Morgenprofil der Probanden

Zeit nach dem Erwachen (min)	Cortisol-Konzentration ($\mu\text{g}/\text{dl}$)					
	Ältere Männer		Ältere Frauen		Jüngere Frauen	
	M	S	M	S	M	S
0	0,38	0,13	0,35	0,13	0,45	0,16
15	0,43	0,13	0,44	0,16	0,51	0,16
30	0,54	0,19	0,53	0,18	0,62	0,28
45	0,57	0,27	0,54	0,19	0,93	0,94
60	0,47	0,22	0,54	0,23	0,63	0,28

M=Mittelwert; S=Standardabweichung

Cortisol-Morgenprofile

Neben der Aufwachkonzentration sind Cortisol-Morgenprofile von Bedeutung. Sie zeigen die Veränderung der Cortisol-Konzentrationen über die ersten 60 Minuten nach dem Erwachen (Tab. 36) an.

Die Anfangskonzentrationen, also direkt nach dem Erwachen der Probanden, liegen relativ dicht beieinander. Innerhalb der ersten 30 Minuten sind die Konzentrations-Werte der beiden älteren Probandengruppen fast gleich. In der Gruppe der männlichen Probanden wird der Maximalwert mit einer Konzentration von $0,57 \pm 0,27 \mu\text{g}/\text{dl}$ 45 Minuten nach dem Erwachen erreicht. Danach sinkt die Konzentration wieder ab, und liegt 60 Minuten nach dem Erwachen mit einer Konzentration von $0,47 \pm 0,22 \mu\text{g}/\text{dl}$ leicht unter dem zeitgleichen Wert der älteren Probandinnen. Auch die jüngeren Probandinnen erreichen ihren Maximalwert von $0,93 \pm 0,94 \mu\text{g}/\text{dl}$ 45 Minuten nach dem Aufwachen. Die Werte der jüngeren Probandinnen liegen zu jedem Zeitpunkt über denen der älteren Probanden. Außerdem ist die Differenz zwischen Minimum und Maximum in der jüngeren Probandengruppe wesentlich größer als bei den älteren Probanden. In allen Probandengruppen liegt der Minimalwert im Mittel jedoch direkt nach dem Aufwachen vor und die maximale Konzentration wird 45 Minuten nach dem Erwachen erreicht.

CAR-Werte

Der dritte charakteristische Wert, der im Zusammenhang mit den Speichel-Cortisol-Konzentrationen angegeben werden soll, ist der CAR-Wert. Berechnungsformel und Bedeutung wurden im Einleitungs- bzw. Methodenteil erläutert.

Die Tabelle 37 zeigt die mittleren Car-Werte in den drei Probandengruppen. Es zeigt sich, dass der mittlere CAR-Wert in der Gruppe der jüngeren Frauen am höchsten, und in der Gruppe der älteren Frauen am niedrigsten ist. Man kann jedoch feststellen, dass die Werte insgesamt nahe beieinander liegen.

Tab. 37: CAR-Werte von drei Probandengruppen

	N	CAR	
		M	S
Ältere Männer	14	0,74	0,25
Ältere Frauen	20	0,67	0,17
Jüngere Frauen	10	0,82	0,32

M = Mittelwert; S = Standardabweichung; CAR = Cortisol Awakening Response

4.2.9 Melatonin-Abendprofile und DLMO

Melatonin-Abendprofile

Für die Erstellung von Melatonin-Abendprofilen wurden im Zeitraum von 17 bis 24 Uhr stündlich Speichelproben gesammelt. Den abendlichen Verlauf der Melatonin-Speichelkonzentrationen in drei Probandengruppen zeigt Tabelle 38.

Tab. 38: Verlauf der Melatonin-Konzentrationen im Zeitraum von 17 bis 24 Uhr bei drei Probandengruppen

Uhrzeit (Std)	Melatonin-Konzentrationen (pg/ml)					
	Ältere Männer (N = 14)		Ältere Frauen (N = 20)		Jüngere Frauen (N = 10)	
	M	S	M	S	M	S
17	12,15	25,16	10,01	15,59	16,20	28,86
18	8,04	9,94	16,59	34,80	13,49	20,29
19	14,11	29,40	20,90	42,51	40,91	105,80
20	14,40	22,37	12,92	24,91	31,43	64,35
21	13,59	14,98	26,58	45,41	47,81	78,47
22	12,56	11,19	18,62	23,07	56,62	86,32
23	15,93	16,49	27,09	40,06	35,27	27,82
24	20,50	29,08	23,50	24,37	54,01	52,49

M = Mittelwert; S = Standardabweichung

Wie zu erkennen ist, ähneln sich die Verläufe der drei Gruppen, unterscheiden sich aber in der Konzentrationen. In allen drei Gruppen findet sich der niedrigste Wert um 17 Uhr. Ab spätestens 18 Uhr ist ein Anstieg zu verzeichnen. Bis zum Messzeitende um 24 Uhr gibt es lediglich zwischen 19 und 20 Uhr einen Konzentrations-Abfall in beiden Frauen-Gruppen. Der größte Unterschied ergibt sich aus der Konzentrations-Höhe. So liegen die Werte der jungen Frauen stets über den Werten der älteren Studienteilnehmer. Innerhalb der älteren Probanden sind wiederum die Werte der Frauen zu jedem Zeitpunkt höher als die der Männer.

Zeitpunkt und Schwellenwertkonzentration des DLMOs

Der DLMO ist ein sehr zuverlässiger Wert, der die Beurteilung der circadianen Phasenlage eines Menschen erlaubt. In Tabelle 39 dargestellt ist einerseits der Mittelwert, mit dessen Erreichen die Probanden in den verschiedenen Gruppen die Konzentration des DLMO erreicht haben, sowie die zugehörige Standardabweichung. Besonders auffällig ist hier die Höhe der Standardabweichung, die für eine große Variabilität der Konzentrationen zwischen den einzelnen Probanden spricht.

Weiterhin dargestellt ist der Zeitpunkt, an dem die Probanden im Mittel ihren DLMO-Schwellenwert erreichen. Dieser liegt in den aufgeführten Gruppen zwischen der 1210. Minute des Tages und der 1222. Minute des Tages. Dies bedeutet, dass der DLMO im Mittel in allen drei Gruppen zwischen 20:10 Uhr und 20:22 Uhr erreicht wird. Somit liegen die Werte relativ nahe beieinander.

Tab. 39: DLMO-Schwelle sowie Zeitpunkt des DLMOs

	N	DLMO-Schwelle (pg/ml)		DLMO-Zeitpunkt (min)	
		M	S	M	S
Ältere Männer	14	21,21	42,74	1216,33	39,27
Ältere Frauen	20	23,33	49,55	1222,00	60,27
Jüngere Frauen	10	36,42	85,60	1210,22	46,00

DLMO = Dim Light Melatonin Onset: M = Mittelwert; S = Standardabweichung

4.2.10 Tages-Expressionsprofile der Uhrgene *hBMAL1* und *hPER1*

Untersucht wurde die Expression der Uhrgene (Zielgene) *hBMAL1* und *hPER1* zu verschiedenen Tageszeiten (8, 12, 16, 20, 22 und 24 Uhr) in den drei Probandengruppen. Die mittleren Werte der Ratios dieser Zielgene zum Haushaltsgen *h36B4* sind in der Tabelle 40 aufgelistet.

Tab. 40: Expression der Uhrengene *hBMAL1* und *hPER1*. Angegeben sind die Ratios aus Zielgen und Haushaltsgen *h36B4*

Uhrzeit (Std)	Ratio <i>hBMAL1/h36B4</i>						Ratio <i>hPER1/h36B4</i>					
	Ältere Männer (N=11)		Ältere Frauen (N=13)		Jüngere Frauen (N=10)		Ältere Männer (N=10)		Ältere Frauen (N=12)		Jüngere Frauen (N=10)	
	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S
8	0,60	0,62	0,69	0,72	0,32	0,29	0,54	0,32	0,62	0,57	0,52	0,35
12	0,72	0,60	1,27	1,41	0,70	0,70	0,80	0,69	0,50	0,47	0,79	0,65
16	1,07	0,66	1,23	1,37	0,75	0,95	0,86	0,76	0,50	0,44	0,69	0,84
20	0,98	0,99	2,66	5,25	0,95	1,08	0,86	0,46	0,56	0,61	0,45	0,42
22	0,69	0,56	2,89	6,66	0,61	0,83	0,72	0,38	0,73	0,61	0,46	0,41
24	0,66	0,59	16,16	54,21	0,50	0,60	0,71	0,43	0,81	0,78	0,59	0,66

M = Mittelwert ; S = Standardabweichung

Expressionsprofil des Uhrengens *hBMAL1*

Wie aus Tabelle 40 hervorgeht, zeigen die älteren Frauen zu jedem Zeitpunkt die höchste Expression des Uhrengens *hBMAL1*. Gerade im Zeitraum von 20 bis 24 Uhr ist in dieser Gruppe ein deutlicher Expressions-Anstieg zu verzeichnen. Besonders der 24-Uhr-Wert ist wesentlich höher als alle anderen Werte. Die Expression dieses Uhrengens ist bei jüngeren Frauen am niedrigsten. Diejenige der älteren Männer liegt dazwischen. Es fällt eine sehr hohe Variation der Expressionsrate bei älteren Frauen zum Zeitpunkt 24 Uhr auf. Diese ist an der großen Standardabweichung erkennbar. Die Expression des Uhrengens *hBMAL1* ist bei den älteren Männern stets höher als die der jüngeren Frauen. In beiden Gruppen findet sich die geringste Expression um acht Uhr morgens. Im weiteren Verlauf ist zunächst ein kontinuierlicher Anstieg der Expression des Gens *hBMAL1* erkennbar. Während die Männer den gruppeneigenen Maximalwert jedoch bereits um 16 Uhr mit einer mittleren Ratio von $1,07 \pm 0,66$ erreichen, steigt die Expression bei den jüngeren Frauen noch bis um 20 Uhr an. Zu diesem Zeitpunkt liegt ihre mittlere Ratio bei $0,95 \pm 1,08$. In beiden Gruppen sinkt die Expression bis 24 Uhr weiter ab. Die Verläufe dieser beiden Gruppen ähneln sich deutlich.

Expressionsprofil des Uhrengens *hPER1*

Auch zwischen den Ratios der Gene *hPER1* und *h36B4*, die ebenfalls in der Tabelle 40 dargestellt wurden, gibt es deutliche Unterschiede zwischen den drei Probandengruppen. Bei den jüngeren Frauen findet sich mittags die höchste Expression des Uhrengens *hPER1*. Das Expressions-Minimum liegt bei 20 Uhr abends. In der Gruppe der älteren Männer erfolgt die maximale Expression des Uhrengens *hPER1* zwischen 16 und 20 Uhr. Die geringste

Expression erfolgt morgens gegen acht Uhr. Feststellbar ist, dass die älteren männlichen Probanden ihren Minimalwert um acht Uhr morgens aufweisen und im Zeitraum von 20 bis 24 Uhr wiederum ein Absinken erkennbar ist. Dies würde bedeuten, dass die Expression des Gens *hPER1* bei älteren Männern um mehrere Stunden rückverlagert ist. Bei den älteren Frauen wird *hPER1* zwischen zwölf und 16 Uhr am geringsten exprimiert. Ab dann beginnt ein Anstieg der Expressionsrate bis um 24 Uhr.

4.3 Gruppenvergleiche

Im Rahmen dieser Studie sollte untersucht werden, ob circadiane Markersysteme (Körpertemperatur, Hormone, Uhrengen-Expression) durch die drei Kriterien Alter, Geschlecht und Schlafqualität beeinflusst werden. Nachfolgend erfolgen deshalb für jedes Markersystem Gruppenvergleiche, separat nach diesen drei Kriterien.

4.3.1 Kriterium Alter

Um altersbedingte Unterschiede in circadianen Markersystemen aufdecken zu können, sollen im nachfolgenden Teil die Untersuchungsergebnisse von älteren und jüngeren Studienteilnehmerinnen verglichen werden.

4.3.1.1 Vergleich der Körperkerntemperatur-Profile von jüngeren und älteren Frauen

Eine Übersicht über die mittleren Körperkerntemperaturen der verschiedenen Probandengruppen wurde bereits unter Punkt 4.2.7 dargestellt. Die beobachteten Mittelwert-Unterschiede wurden mit dem t-Test für unabhängige Stichproben auf statistische Signifikanz untersucht (Tab. 41). Wie zu erkennen ist, bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Körperkerntemperaturen um 20 und 22 Uhr, um 23 und 24 Uhr sind die Unterschiede sogar sehr signifikant. Um 22 Uhr liegt der Wert mit $p = 0,054$ an der Signifikanzgrenze. Diese Ergebnisse sind in der Abbildung 46 graphisch dargestellt

Ergebnisse

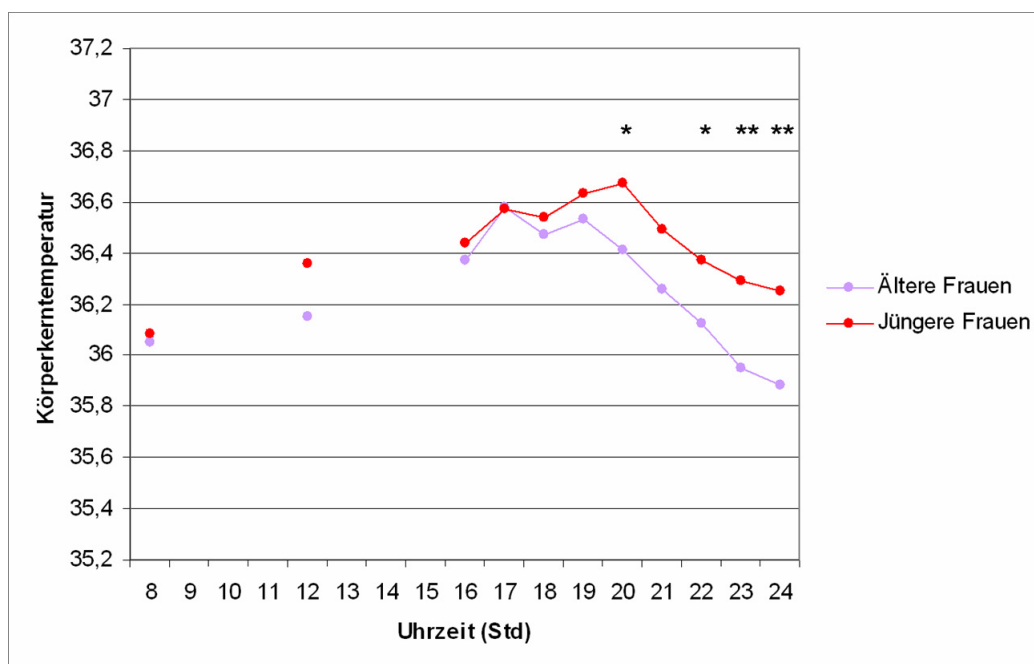


Abb. 46: Verlauf der Körperkerntemperatur bei zehn jüngeren und 20 älteren Probandinnen. Es treten statistisch signifikante Unterschiede um 20, 21, 23 und 24 Uhr auf. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$

Tab. 41: Gruppenvergleiche des tageszeitlichen Körperkerntemperatur-Verlaufs von zehn jüngeren und 20 älteren Frauen

Variable	Levene-Test		T-Test	
	F	p.	t	p
Temperatur (°C) - 08 Uhr	0,71	0,407	0,2	0,843
Temperatur (°C) - 12 Uhr	2,08	0,161	1,23	0,228
Temperatur (°C) - 16 Uhr	0,18	0,674	0,46	0,647
Temperatur (°C) - 17 Uhr	0,23	0,636	-0,08	0,940
Temperatur (°C) - 18 Uhr	0,75	0,395	0,71	0,486
Temperatur (°C) - 19 Uhr	1,31	0,262	1,23	0,230
Temperatur (°C) - 20 Uhr	0,16	0,694	2,48	0,020
Temperatur (°C) - 21 Uhr	0,02	0,894	2,01	0,054
Temperatur (°C) - 22 Uhr	<0,00	0,992	2,07	0,048
Temperatur (°C) - 23 Uhr	0,08	0,781	3,24	0,003
Temperatur (°C) - 24 Uhr	0,05	0,831	3,07	0,005

F= Prüfgröße im Levene-Test; t = Prüfgröße im t-Test; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

4.3.1.2 Vergleich der Schlafqualität von jüngeren und älteren Frauen

Die Schlafqualität der Probanden wurde mit Hilfe des PSQI-Fragebogens ermittelt. In Kapitel 4.2.4 findet sich eine Übersicht über die Punkte und weitere Variablen, die die Probanden im Mittel in den verschiedenen Gruppen erhielten. Bei dem Vergleich der Mittelwerte von älteren und jüngeren Frauen mit dem t-Test für unabhängige Stichproben (Tab. 42) zeigte sich, dass es in den Variablen Aufstehzeit und Schlafdauer signifikante Mittelwert-Unterschiede gibt. Der Unterschied des Mittelwertes der Schlafqualität ist sehr signifikant. Diese Unterschiede sind graphisch in den Abbildungen 47, 48 und 49 dargestellt. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Zubettgehzeit und der Einschlafdauer zwischen den genannten Probandengruppen nachgewiesen werden.

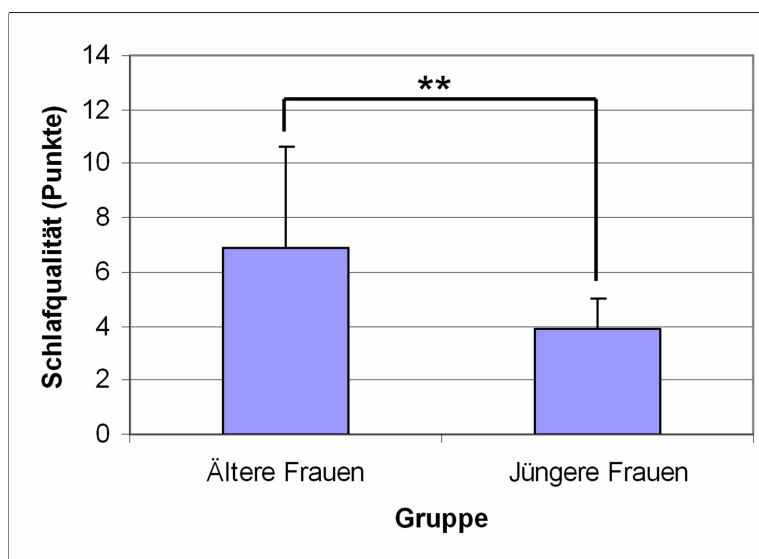


Abb. 47: Unterschiede in der Schlafqualität von zehn jüngeren und 20 älteren Frauen. Die Mittelwerte der Gruppen unterscheiden sich statistisch sehr signifikant ($p = 0,003$). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. ** = $p \leq 0,005$

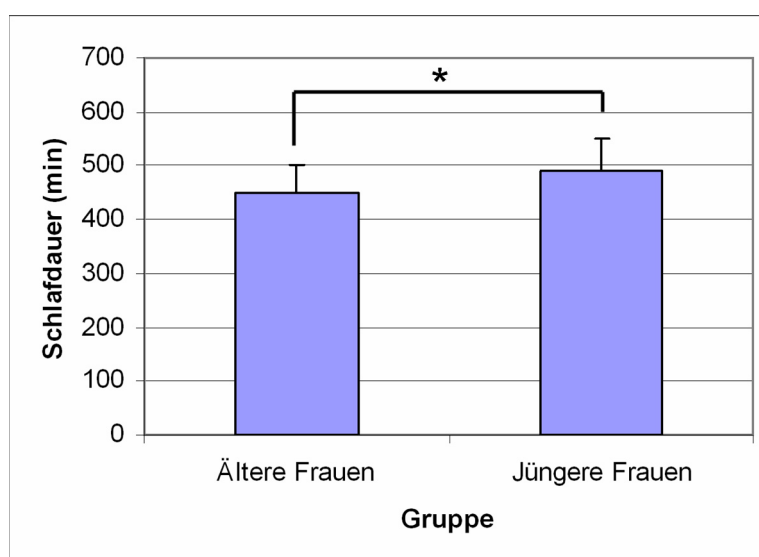


Abb. 48: Unterschiede in der Schlafdauer von zehn jüngeren und 20 älteren Frauen. Die Mittelwerte der Gruppen unterscheiden sich statistisch signifikant ($p = 0,050$). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. * = $p \leq 0,05$

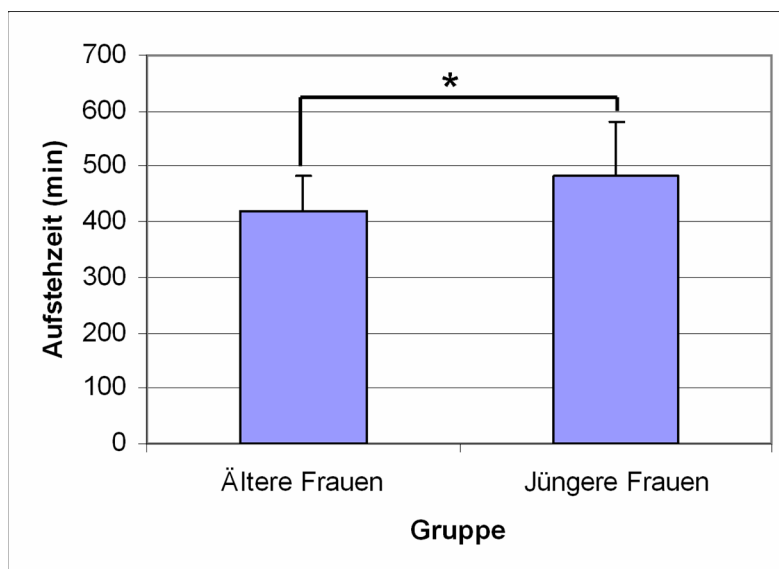


Abb. 49: Vergleich des Aufstehzeitpunkts zwischen zehn jüngeren und 20 älteren Frauen. Die Mittelwerte der Gruppen unterscheiden sich statistisch signifikant ($p= 0,038$). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwerts an. * = $p \leq 0,05$

Tab. 42: Gruppenvergleiche von fünf Variablen, die mit Hilfe des PSQI-Fragebogens von zehn jüngeren und 20 älteren Frauen ermittelt wurden

Variable	Levene-Test		t-Test	
	F	p	t	p
Schlafqualität (Punkte)	16,9	$\leq 0,000$	-3,34	0,003
Zubettgehzeit (min)	1,19	0,284	1,07	0,293
Einschlafdauer (min)	0,90	0,352	-0,79	0,434
Aufstehzeit (min)	2,61	0,118	2,18	0,038
Schlafdauer (min)	0,21	0,649	2,05	0,050

4.3.1.3 Vergleich der Cortisol-Morgenprofile, -Aufwachkonzentrationen und CAR von jüngeren und älteren Frauen

Die Werte für das Cortisol-Aufwach-Profil inklusive der Cortisol-Aufwachkonzentration und die CAR-Werte wurden bereits im Abschnitt 4.2.8 für die verschiedenen Probandengruppen dargestellt. Mit Hilfe des t-Tests für unabhängige Stichproben wurden die Werte der älteren und jüngeren Frauen auf statistische Signifikanz getestet (Tab. 43). Es stellte sich heraus, dass es keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen den Mittelwerten in diesen Gruppen gibt.

Tab. 43: Gruppenvergleiche von Cortisol-Morgenprofil mit Cortisol-Aufwachkonzentration (0 min) und CAR-Wert von zehn jüngeren und 20 älteren Frauen

Variable	Levene-Test		T-Test	
	F	p	t	p
Cortisol ($\mu\text{g/dl}$) - 0 min	0,09	0,769	1,86	0,074
Cortisol ($\mu\text{g/dl}$) - 15 min	0,34	0,567	1,01	0,319
Cortisol ($\mu\text{g/dl}$) - 30 min	2,31	0,139	1,07	0,294
Cortisol ($\mu\text{g/dl}$) - 45 min	9,60	0,004	1,31	0,222
Cortisol ($\mu\text{g/dl}$) - 60 min	0,38	0,541	1,00	0,326
CAR	6,507	0,016	-1,377	0,194

F= Prüfgröße im Levene-Test; t = Prüfgröße im t-Test; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

Cortisol-Aufwachkonzentration

Wie Abbildung 50 zeigt, weisen jüngere Frauen eine höhere Cortisol-Aufwach-Konzentration auf, als ältere Frauen. Mit Hilfe des t-Tests für unabhängige Stichproben konnte gezeigt werden, dass diese Unterschiede statistisch nicht signifikant sind (Tab. 43).

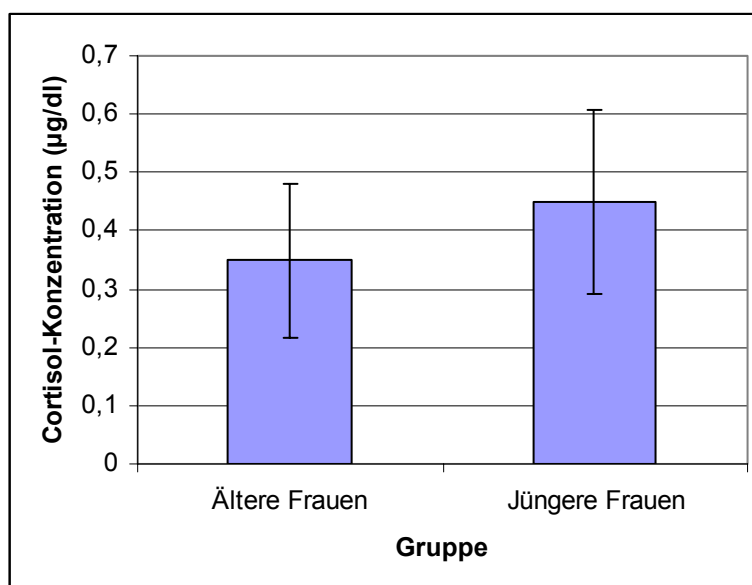


Abb. 50: Vergleich der Cortisol-Aufwachkonzentration bei zehn jüngeren und 20 älteren Frauen. Die Konzentration weist bei den jüngeren Frauen mit $0,45 \pm 0,16 \mu\text{g/dl}$ einen höheren Wert auf als bei den älteren Frauen mit einem Wert von $0,35 \pm 0,13 \mu\text{g/dl}$. Dieser Altersunterschied ist statistisch nicht signifikant ($t = 1,86$; $p = 0,074$). Die Fehlerbalken geben die doppelte Standardabweichung des Mittelwerts an.

Cortisol-Aufwachkonzentration (CAR)

Dementsprechend ist auch der CAR-Wert bei jüngeren Frauen höher als bei den älteren Frauen (Abb. 51). Auch diese Unterschiede wiesen laut t-Test keine statistisch signifikanten Unterschiede auf (Tab. 43).

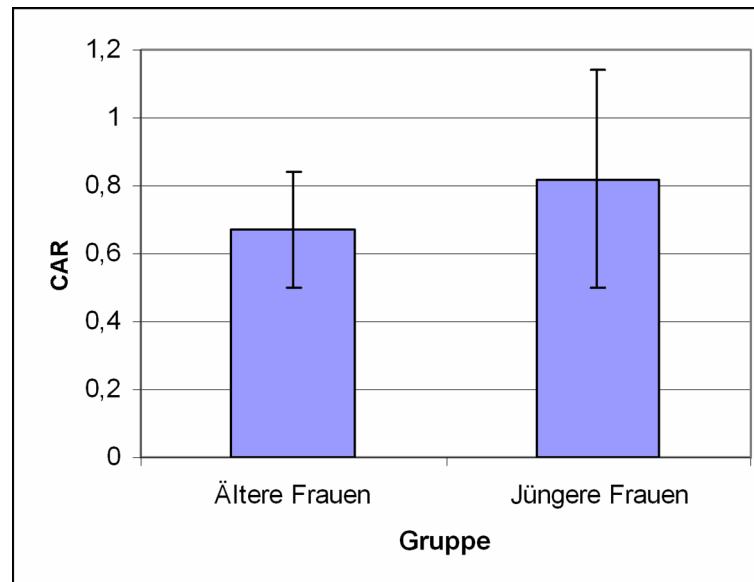


Abb. 51: Vergleich der mittleren CAR-Werte bei jüngeren und älteren Probandinnen. Die älteren Probandinnen wiesen im Mittel niedrigere CAR-Werte ($0,67 \pm 0,17$) auf als jüngere Probandinnen ($0,82 \pm 0,32$). Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant ($t = -1,377$; $p = 0,194$)

Cortisol-Morgenprofil

In der Tabelle 36 wurden bereits die Cortisol-Konzentrationen aufgeführt, die zur Erstellung eines Cortisol-Morgenprofils nötig sind. Die Abbildung 52 stellt die Cortisol-Morgenprofile von jüngeren und älteren Probandinnen innerhalb der ersten Stunde nach dem Erwachen gemeinsam dar.

Die mittleren Speichel-Cortisol-Konzentrationen der jüngeren Frauen sind zu jedem Zeitpunkt höher als die der älteren Probandinnen. Während der ersten 30 Minuten nach dem Erwachen verlaufen die Cortisol-Kurven etwa parallel zueinander. Zwischen der 30. und 45. Minute erfolgt jedoch ein starker Anstieg der Cortisol-Konzentration um fast 50% in der Gruppe der jüngeren Frauen. Zwischen der 45. und 60. Minute nach dem Erwachen sinkt dieser Wert wieder auf etwa die Höhe ab, die 30 Minuten nach dem Erwachen erreicht war. Die Kurve der älteren Frauen zeigt diesen starken Anstieg nicht. In dieser Gruppe bleibt der Cortisol-Spiegel von der 30. Minute bis zur 60. Minute auf etwa der gleichen Höhe. Diese Gruppenunterschiede sind statistisch nicht signifikant (Tab. 43).

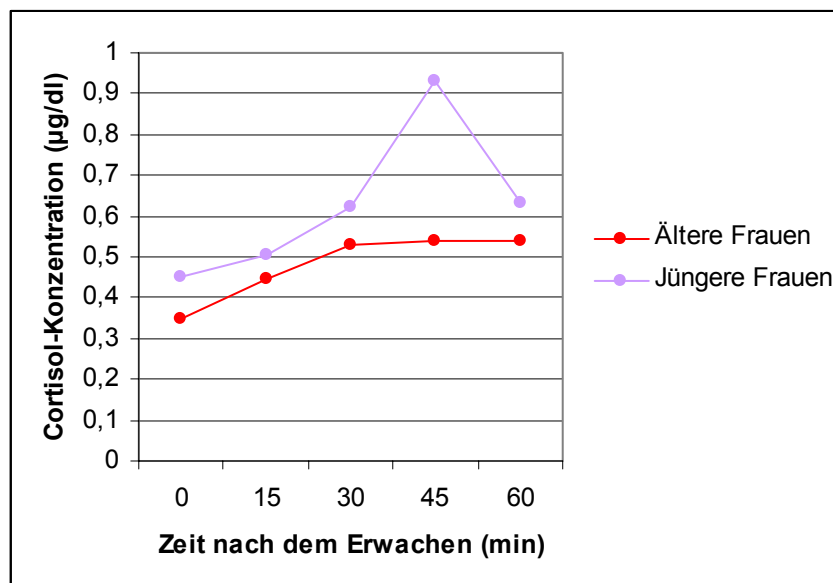


Abb. 52: Vergleich der Cortisol-Morgenprofile von jüngeren und älteren Probandinnen. Die Gruppenunterschiede zu keinem der fünf Messzeitpunkte statistisch signifikant ($p > 0,05$).

4.3.1.4 Vergleich der Melatonin-Abendprofile und des DLMOs von jüngeren und älteren Frauen

Melatonin-Abendprofile

In Abschnitt 4.2.9 wurden bereits die Mittelwerte der einzelnen Probandengruppen gezeigt, die der Erstellung von Melatonin-Abendprofilen und der Berechnung des DLMOs dienen. Eine Überprüfung auf Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov zeigte, dass die Variablen teilweise nicht normalverteilt waren (Anhang A15). Der Vergleich der Mittelwertunterschiede zwischen den älteren und jüngeren Frauen bezüglich der Melatoninkonzentrationen um 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 und 24 Uhr fand deshalb mit Hilfe des U-Tests nach Mann-Whitney statt. Gleiches gilt für die DLMO-Werte von jüngeren und älteren Frauen (Tab. 44). Es zeigte sich, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen der Speichel-Melatonin-Konzentration zwischen jüngeren und älteren Frauen um 22 Uhr gibt. Die Melatonin-Abendprofile der jüngeren und älteren Frauen sind in Abbildung 53 graphisch dargestellt.

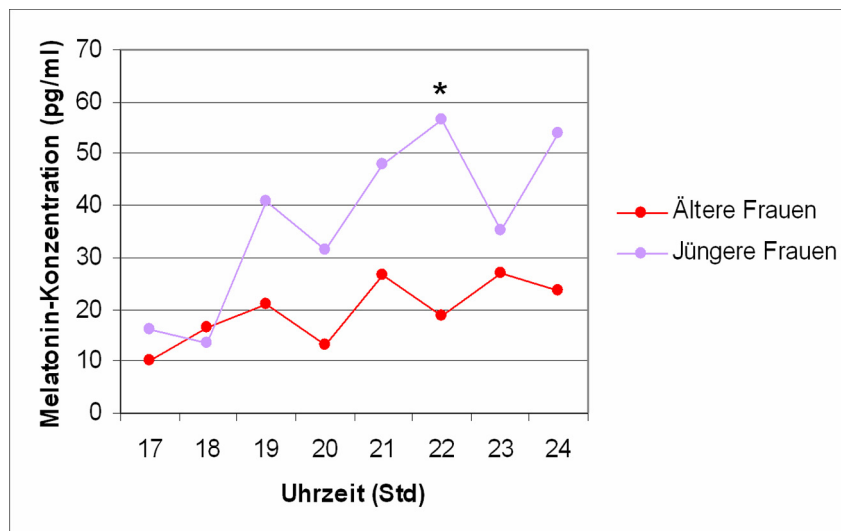


Abb. 53: Vergleich der Melatonin-Abendprofile von zehn jüngeren und 20 älteren Frauen. Die Gruppenunterschied unterscheiden sich um 22 Uhr statistisch signifikant ($p = 0,044$)

Tab. 44: Gruppenvergleiche von Melatonin-Abendprofilen und DLMO- Schwellenwert sowie DLMO-Zeitpunkt von zehn jüngeren und 20 älteren Frauen. Es wurde der U-Test nach Mann und Whitney angewandt

Variable	U-Test	
	Z	p
Melatonin (pg/ml) - 17 Uhr	-1,28	0,214
Melatonin (pg/ml) - 18 Uhr	-1,14	0,267
Melatonin (pg/ml) - 19 Uhr	-0,70	0,502
Melatonin (pg/ml) - 20 Uhr	-1,80	0,074
Melatonin (pg/ml) - 21 Uhr	-1,58	0,120
Melatonin (pg/ml) - 22 Uhr	-2,02	0,044
Melatonin (pg/ml) - 23 Uhr	-1,63	0,109
Melatonin (pg/ml) - 24 Uhr	-1,89	0,061
DLMO - Melatonin-Schwelle (pg/ml)	-1,19	0,248
DLMO - Melatonin-Zeit (min)	-0,79	0,452

Z = Prüfgröße; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

Dim Light Melatonin Onset (DLMO)

Die Werte von DLMO-Zeitpunkt und -Konzentration von jüngeren und älteren Frauen finden sich in der Tabelle 39. Die Abbildung 54 stellt die Werte graphisch dar. Ein Test nach Kolmogorov-Smirnov zeigte, dass die DLMO-Zeitpunkte von jüngeren und älteren Frauen keiner Normalverteilung unterliegen (Anhang A15). Um zu testen, ob die DLMO-Mittelwerte in diesen beiden Gruppen statistisch signifikante Zusammenhänge zeigen, wurde deshalb der U-Test nach Mann und Whitney verwendet. Es zeigte sich, dass keine statistisch signifikanten Unterschiede auftraten (Tab. 44).

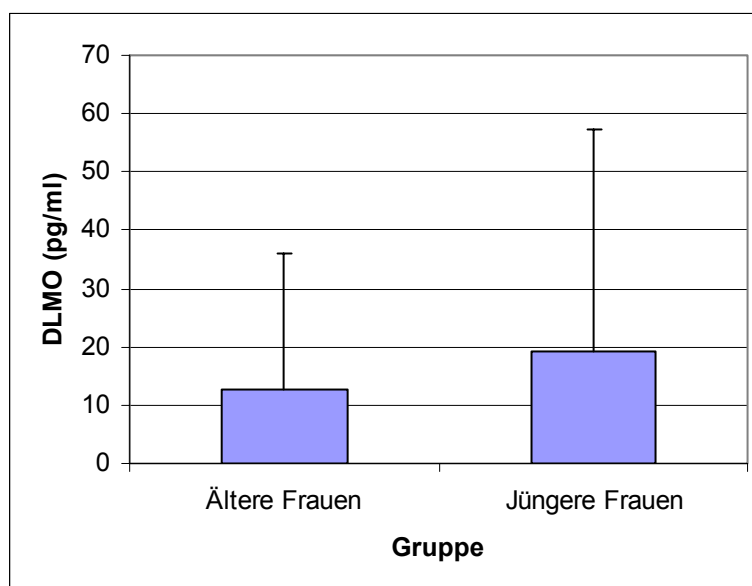


Abb. 54 Vergleich der mittleren DLMO-Werte von 20 älteren und zehn jüngeren Frauen. Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant.

4.3.1.5 Vergleich der tageszeitlichen Expressionsprofile der Uhrengene *hBMAL1* und *hPer1* von jüngeren und älteren Frauen

Expressionsprofile des Uhrengens *hBMAL1*

Die mittleren Expressions-Ratios von *hBMAL1/h36B4* der jüngeren und älteren Probandinnen zeigt Abbildung 55. Die zugehörigen Werte finden sich in der Tabelle 40. Der zeitliche Verlauf der Expression des Gens *hBMAL1* ist wiedergegeben durch die dargestellten Verhältnisse von Zielgen zu Haushaltsgen. Sieht man sich nun den Verlauf der Expression an, so zeigt sich, dass vor allem die Höhe der erreichten Werte in den beiden Probandinnen-Gruppen verschieden ist. Die mittlere minimale Expression in der Gruppe der jüngeren Frauen wurde morgens um acht Uhr gemessen. Ab diesem Zeitpunkt stieg die Expression durchgehend, bis sie ihr Maximum gegen 20 Uhr erreicht hatte, und sank dann wieder bis zum Messzeitende um 24 Uhr ab.

Auch bei den älteren Frauen findet sich das Expressions-Minimum um acht Uhr morgens, und die Werte stiegen daraufhin an. Allerdings gibt es kein erkennbares Maximum, von dem aus die Werte wieder absinken würden. Es fällt auf, dass der Unterschied zwischen Minimum und Maximum der mittleren Ratios sich in beiden Gruppen stark unterscheidet. Die Differenz beträgt bei den jüngeren Probandinnen 0,63. Da der mittlere Minimalwert bei 0,32 liegt, bedeutet dies, dass sich die relative Expression im Zeitraum von acht bis 24 Uhr etwa um den Faktor drei ändert. Bei den älteren Frauen ist dieser Unterschied wesentlich größer. In dieser Gruppe steht zwischen dem Minimum und dem maximalen Wert der Faktor 23,4.

Diese Werte wurden mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung untersucht. Es stellte sich heraus, dass in der Gruppe der jüngeren Frauen alle Werte normalverteilt sind. In der Gruppe der älteren Frauen waren die Werte von 22 und 24 Uhr nicht normalverteilt (Anhang A15). Der Mittelwertvergleich der Gen-Ratios von acht, zwölf, 16 und 20 Uhr erfolgte deshalb mit dem t-Test für unverbundene Stichproben (Tab. 45), der Mittelwertvergleich der Ratios von 22 und 24 Uhr erfolgte mittels des U-Tests nach Mann und Whitney (Tab. 46). Diese Unterschiede sind jedoch statistisch nicht signifikant (Tab. 45, Tab. 46).

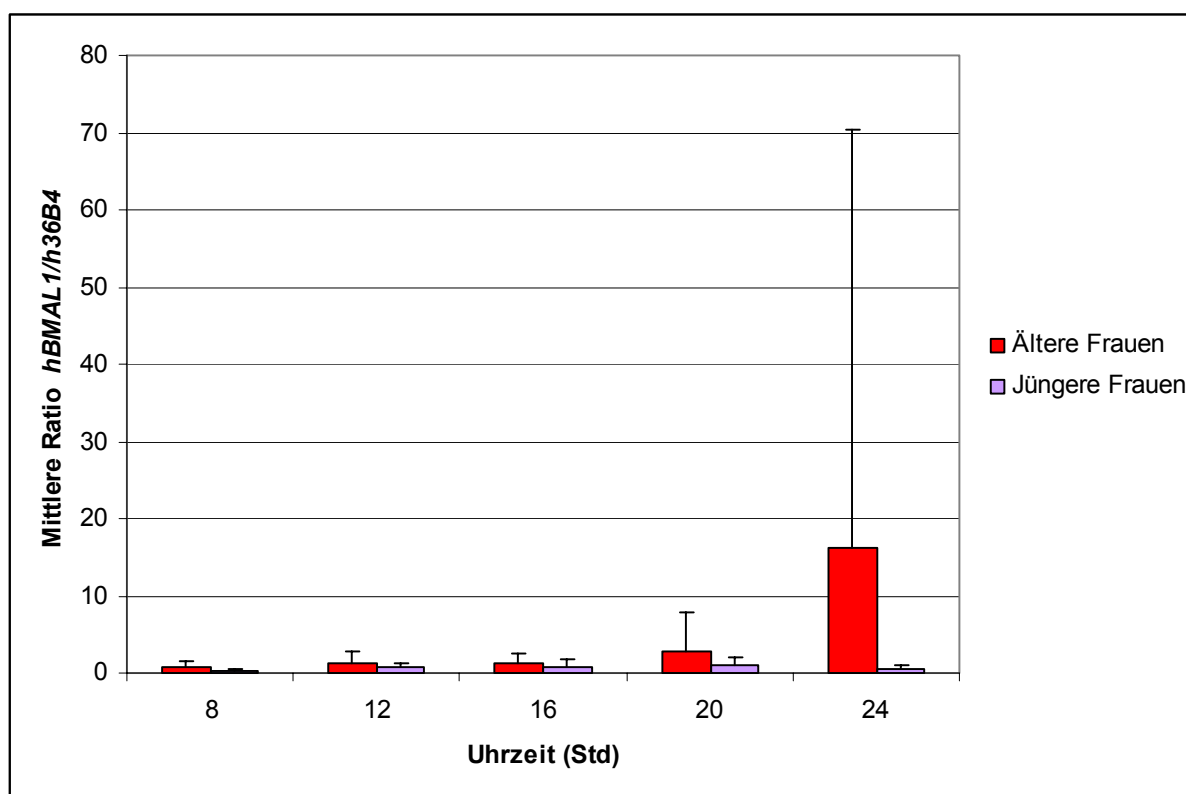


Abb. 55: Vergleich der Expressionsprofile des Uhrengens *hBMAL1* bei jüngeren und älteren Probandinnen. Dargestellt sind die mittleren Ratios von *hBMAL1* zu dem Haushaltsgen *h36B4* im Abstand von jeweils vier Stunden. Die Unterschiede sind zu keinem der fünf Messzeitpunkte statistisch signifikant ($p > 0,05$).

Tab. 45: Gruppenvergleiche des Expressionsprofils des Uhrengens *hBMAL 1* von zehn jüngeren und 13 älteren Frauen. Verglichen wurde die Expression zu den Zeitpunkten 8, 12, 16 und 20 Uhr. Es wurde der t-Test für unverbundene Stichproben angewandt

Variable	Levene-Test		t-Test	
	F	p	t	p
<i>hBMAL1/h36B4</i> - 08 Uhr	2,26	0,148	-1,53	0,141
<i>hBMAL1/h36B4</i> - 12 Uhr	1,31	0,265	-1,17	0,255
<i>hBMAL1/h36B4</i> - 16 Uhr	1,67	0,201	-0,95	0,354
<i>hBMAL1/h36B4</i> - 20 Uhr	2,51	0,128	-1,01	0,325

F = Prüfgröße im Levene-Test; t = Prüfgröße im t-Test; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

Tab. 46: Gruppenvergleiche des Expressionsprofils des Uhrengens *hBMAL 1* von zehn jüngeren und 13 älteren Frauen. Verglichen wurde die Expression zu den Zeitpunkten 22 und 24 Uhr. Es wurde der U-Test nach Mann und Whitney angewendet

Variable	U-Test	
	Z	p
<i>hBMAL1/h36B4</i> - 22 Uhr	-1,364	0,186
<i>hBMAL1/h36B4</i> - 24Uhr	-1,892	0,057

Z = Prüfgröße; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

Expressionsprofile des Uhrengens *hPER1*

Die mittleren Ratios der Gene *hPER1/h36B4* der jüngeren und älteren Frauen sind in Abbildung 56 dargestellt. Die zugehörigen Werte finden sich in der Tabelle 40. Im Vergleich wird deutlich, dass sowohl die Höhe der Ratios als auch das Expressions-Schema differieren. Während das Expressions-Minimum der jüngeren Probandinnen in den späten Abendstunden zwischen 20 und 22 Uhr erreicht wird, liegt dieses bei den älteren Frauen bereits wesentlich früher am Tage, nämlich zwischen zwölf und 16 Uhr. Auch die zeitliche Lage des Expressions-Maximums ist in beiden Gruppen eine andere. Während es bei den jüngeren Frauen früher am Tage als das Minimum liegt, ist bei den älteren Probandinnen vom Minimum ausgehend eine stetige Expressionszunahme bis zum Messzeitende um 24 Uhr zu beobachten. Betrachtet man den zwölfstündigen Zeitraum von acht bis 20 Uhr, so erscheinen die Expressionsprofile in ihrem Verlauf entgegengesetzt zu verlaufen. Diese

Gruppenunterschiede konnten nicht als statistisch signifikant abgesichert werden (Tab. 47) und müssen deshalb als zufällig betrachtet werden.

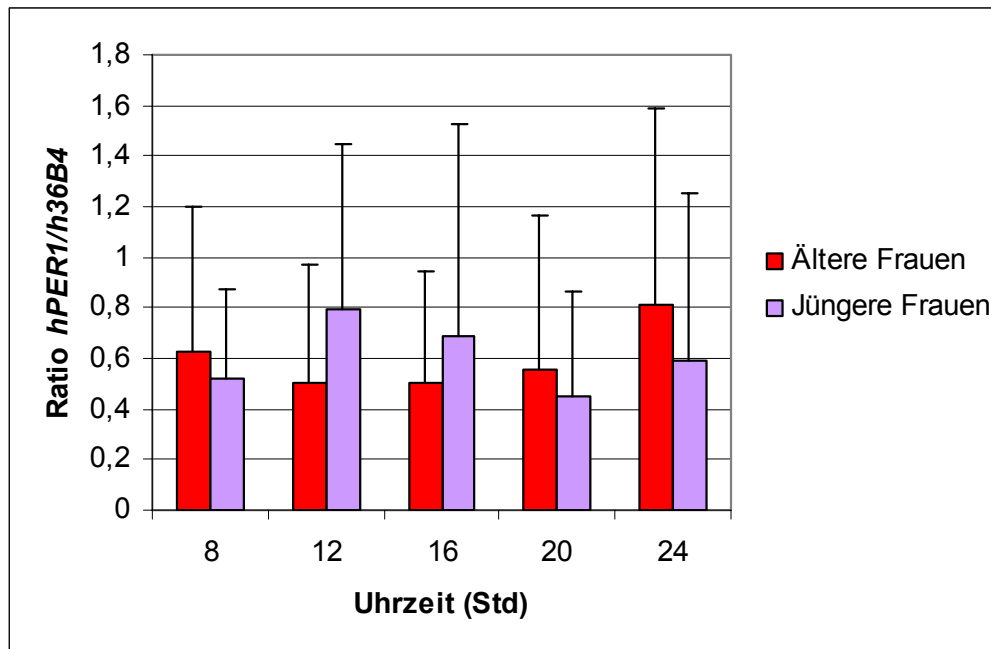


Abb. 56: Expressionsprofil von *hPER1* bei jüngeren und älteren Probandinnen. Dargestellt sind die mittleren Ratios von *hPER1* zu dem Haushaltsgen *h36B4* im Abstand von jeweils vier Stunden

Tab. 47: Gruppenvergleiche der Expressionsprofile des Uhrengens *hPER 1* von zehn jüngeren und 12 älteren Frauen. Es wurde der t-Test für unverbundene Stichproben angewendet

Variable	Levene-Test		t-Test	
	F	p	t	p
<i>hPER1/h36B4</i> - 08 Uhr	2,32	0,144	-0,48	0,637
<i>hPER1/h36B4</i> - 12 Uhr	0,73	0,402	1,22	0,237
<i>hPER1/h36B4</i> - 16 Uhr	2,11	0,162	0,66	0,516
<i>hPER1/h36B4</i> - 20 Uhr	1,50	0,236	-0,47	0,647
<i>hPER1/h36B4</i> - 22 Uhr	1,33	0,263	-1,17	0,255
<i>hPER1/h36B4</i> - 24 Uhr	0,13	0,718	-0,71	0,487

F= Prüfgröße im Levene-Test; t = Prüfgröße im t-Test; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

4.3.2 Kriterium Geschlecht

Nachfolgend sollen bei den älteren Probanden geschlechtsbezogene Vergleiche der circadianen Markersysteme erfolgen.

4.3.2.1 Vergleich der Körperkerntemperatur-Profile von älteren Männern und Frauen

Die Abbildung 57 zeigt den Verlauf der oral gemessenen Körperkerntemperatur-Verläufe der älteren Männer und der älteren Frauen. Die Mittelwerte sind der Tabelle 35 entnommen. Morgens um acht Uhr besteht die größte Differenz ($0,31^{\circ}\text{C}$) zwischen den Mittelwerten beider Gruppen. Während die Probandinnen zu dieser Uhrzeit bereits eine Körperkerntemperatur von $36,05^{\circ}\text{C}$ aufwiesen, lag die Körperkerntemperatur der Männer bei $35,74^{\circ}\text{C}$. Dieser Unterschied ist bereits um 12 Uhr mittags ausgeglichen. Zu diesem Zeitpunkt sind die Temperaturen mit $36,16^{\circ}\text{C}$ bei den Männern und $36,15^{\circ}\text{C}$ bei den Frauen nahezu identisch. Auch der weitere Verlauf beider Kurven ist ähnlich. Beide Kurven steigen bis um 17 Uhr an, sinken kurz ab und steigen dann wieder. Hierbei erreicht die Kurve der Probandinnen um 17 Uhr ihr Maximum von $36,58^{\circ}\text{C}$, während die Männer ihr Temperaturmaximum erst um 20 Uhr mit einem Wert von $36,35^{\circ}\text{C}$ erreichen. Der geschlechtsabhängige Unterschied in der Temperatur um 17 Uhr lässt sich als statistisch signifikant ($t= 2,54$, $p= 0,016$) absichern. Der Test auf Normalverteilung der Variablen wurde mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests durchgeführt, der Mittelwertvergleich mit dem t-Test für unabhängige Stichproben (Tab. 48).

Auffällig ist, dass beide Kurven in den späteren Abendstunden besonders dicht beieinander verlaufen. Beide Kurven sinken ab 20 Uhr in gleichem Maße ab und erreichen um 24 Uhr mit $35,88^{\circ}\text{C}$ beide exakt den selben Wert.

Ergebnisse

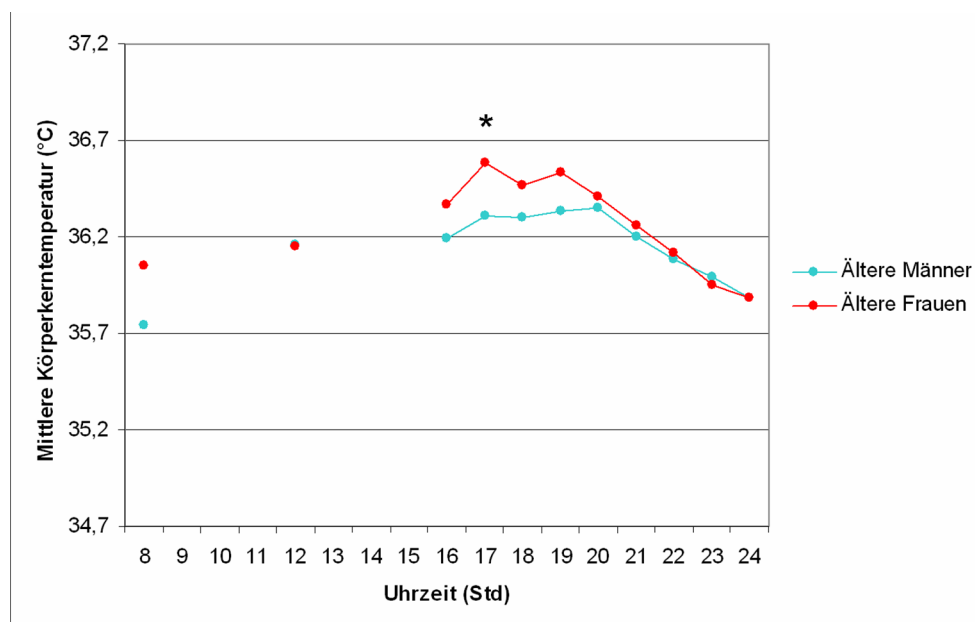


Abb. 57: Vergleich der mittleren Körperkerntemperatur bei älteren 14 älteren Männern und 20 älteren Frauen. Die Geschlechtsunterschiede erweisen sich für 17 Uhr als statistisch signifikant.

Tab. 48: Gruppenvergleiche im tageszeitlichen Körpertemperatur-Verlauf von 14 älteren Männern und 20 älteren Frauen

Variable	Levene-Test		t-Test	
	F	p	t	p
Körperkerntemperatur (°C) - 08 Uhr	3,13	0,087	1,80	0,082
Körperkerntemperatur (°C) - 12 Uhr	0,01	0,939	-0,08	0,940
Körperkerntemperatur (°C) - 16 Uhr	2,90	0,099	1,13	0,267
Körperkerntemperatur (°C) - 17 Uhr	2,41	0,13	2,54	0,016
Körperkerntemperatur (°C) - 18 Uhr	3,68	0,064	1,67	0,105
Körperkerntemperatur (°C) - 19 Uhr	10,36	0,003	1,88	0,078
Körperkerntemperatur (°C) - 20 Uhr	0,46	0,501	0,60	0,554
Körperkerntemperatur (°C) - 21 Uhr	0,73	0,399	0,56	0,579
Körperkerntemperatur (°C) - 22 Uhr	0,18	0,673	0,38	0,707
Körperkerntemperatur (°C) - 23 Uhr	0,88	0,355	-0,37	0,717
Körperkerntemperatur (°C) - 24 Uhr	0,22	0,643	-0,04	0,966

F= Prüfgröße im Levene-Test; t = Prüfgröße im t-Test; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

4.3.2.2 Vergleich der Schlafqualität von älteren Männern und Frauen

In Kapitel 4.2.4 findet sich eine Übersicht über die Punktzahl, nach der die Probanden einer Schläfergruppe zugeordnet wurden, sowie weitere Variablen, die das Schlafverhalten der Studienteilnehmer charakterisieren.

Bei dem Vergleich der Mittelwerte von älteren Männern und Frauen mit dem t-Test für unabhängige Stichproben (Tab. 49) zeigte sich, dass zwischen diesen Gruppen keine signifikanten Mittelwert-Unterschiede zwischen den Variablen auftreten.

Tab. 49: Gruppenvergleiche von fünf Variablen, die mit Hilfe des PSQI-Fragebogens von 14 älteren Männern und 20 älteren Frauen ermittelt wurden

Variable	Levene-Test		t-Test	
	F	p	t	p
Schlafqualität (Punkte)	3,17	0,085	-1,51	0,141
Zubettgehzeit (min)	0,21	0,651	-0,78	0,444
Einschlafdauer (min)	0,11	0,745	-0,57	0,576
Aufstehzeit (min)	0,73	0,400	-0,16	0,874
Schlafdauer (min)	0,23	0,632	0,81	0,421

F= Prüfgröße im Levene-Test; t = Prüfgröße im t-Test; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

4.3.2.3 Vergleich der Cortisol-Morgenprofile, -Aufwachkonzentrationen und CAR von älteren Männern und Frauen

Die Werte für das Cortisol-Aufwach-Profil, die Cortisol-Aufwachkonzentration und die CAR-Werte wurden im Abschnitt 4.2.8 tabellarisch dargestellt. Die Abbildungen 58, 59 und 60 stellen die Werte graphisch dar. Mit Hilfe des t-Tests für unabhängige Stichproben wurden die Werte der älteren Männer und Frauen auf statistische Signifikanz getestet (Tab. 50). Es zeigte sich, dass es keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen den Mittelwerten der genannten Variablen in diesen Gruppen gibt.

Tab. 50: Mittelwertvergleiche von Cortisol-Morgenprofil, Cortisol-Aufwachkonzentration (0 min) und CAR-Wert von 14 älteren Männern und 20 älteren Frauen mit dem t-Test für unabhängige Stichproben

Variable	Levene-Test		T-Test	
	F	p	t	p
Cortisol (µg/dl) - 0 min	0,09	0,769	1,86	0,074
Cortisol (µg/dl) - 15 min	0,34	0,567	1,01	0,319
Cortisol (µg/dl) - 30 min	2,31	0,139	1,07	0,294
Cortisol (µg/dl) - 45 min	9,60	0,004	1,83	0,078
Cortisol (µg/dl) - 60 min	0,38	0,541	1,00	0,326
CAR	6,51	0,016	1,67	0,106

F= Prüfgröße im Levene-Test; t = Prüfgröße im t-Test; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

Cortisol-Aufwachkonzentration

Die Werte für die Cortisol-Aufwachkonzentration im Abschnitt 4.2.8 tabellarisch dargestellt. Die Abbildung 58 stellt die Werte graphisch dar. Man sieht, dass der Wert der älteren Männer höher ist als der der älteren Frauen. Mit Hilfe des t-Tests für unabhängige Stichproben wurden die Werte statistische Signifikanz getestet (Tab. 50). Es zeigte sich, dass es keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen den Mittelwerten gibt.

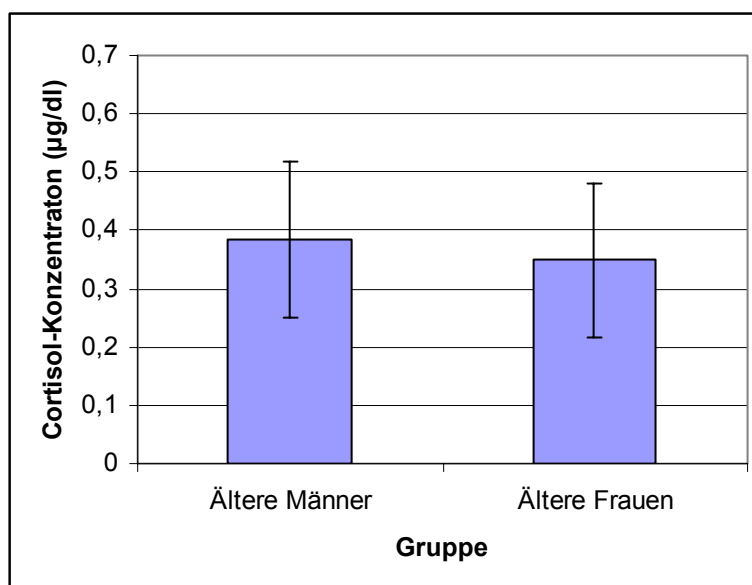


Abb. 58: Vergleich der Cortisol-Aufwach-Konzentrationen von 14 männlichen und 20 weiblichen älteren Probanden. Es treten keine statistisch signifikanten Mittelwertunterschiede auf ($p > 0,05$)

Cortisol-Morgenprofil

Die Abbildung 59 stellt die Cortisol-Morgenprofile von männlichen und weiblichen älteren Probanden graphisch dar. Die Werte für diese Grafik sind der Tabelle 36 entnommen. Während des gesamten Zeitraums verlaufen die Kurven sehr dicht beieinander. Eine Überprüfung der Werte auf statistisch signifikante Mittelwertunterschiede mit dem t-Test nach Student ergab, dass keine signifikanten Unterschiede vorliegen (Tab. 50).

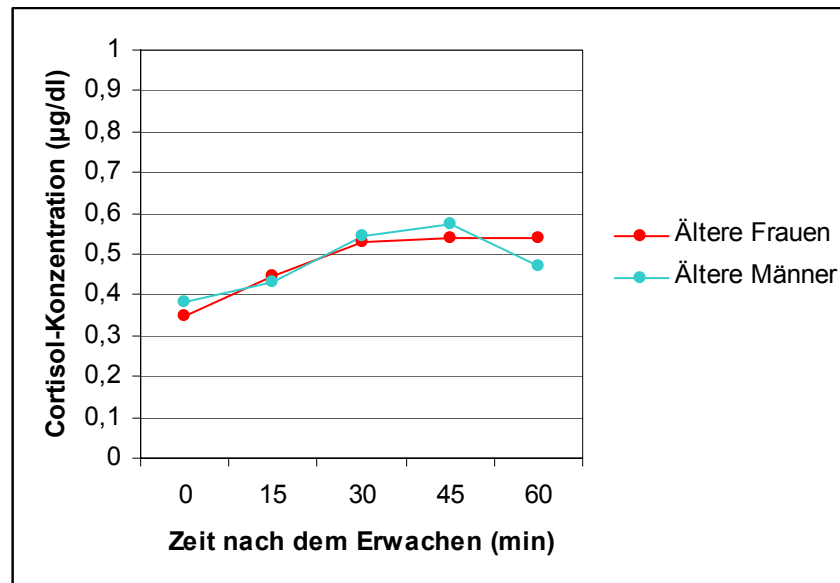


Abb. 59: Vergleich der Cortisol-Morgenprofile von 14 älteren Männern und 20 älteren Frauen. Es treten zu keinem der fünf Messzeitpunkte statistisch signifikante Unterschiede auf ($p > 0,05$)

Cortisol-Aufwach-Reaktion (CAR)

Die CAR-Werte wurden im Abschnitt 4.2.8 dargestellt. Die Abbildung 60 stellt die Werte graphisch dar. Man kann erkennen, dass der mittlere CAR-Wert in der Gruppe der älteren Männer höher ist als der in der Gruppe der älteren Frauen. Mit Hilfe des t-Tests für unabhängige Stichproben wurden die Werte auf das Vorhandensein statistisch signifikanter Zusammenhänge getestet (Tab. 50). Es zeigte sich, dass es keine statistisch signifikanten Zusammenhänge gibt.

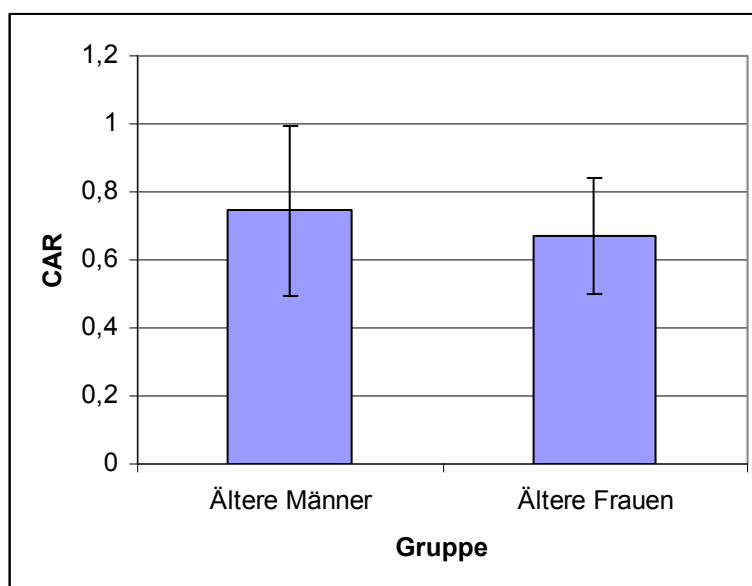


Abb. 60: Vergleich der CAR-Werte von 14 männlichen und 20 weiblichen älteren Probanden. Es treten keine statistisch signifikanten Mittelwertunterschiede auf ($p > 0,05$)

4.3.2.4 Vergleich der Melatonin-Abendprofile und DLMO von älteren Männern und Frauen

Melatonin-Abendprofile

Nachfolgend sollen Melatonin-Werte bei älteren Probanden auf Geschlechtsunterschiede hin geprüft werden.

Die Abbildung 61 stellt den Verlauf der abendlichen Melatonin-Speichel-Konzentrationen bei älteren Männern und Frauen im Zeitraum von 17 bis 24 Uhr dar. Die hierfür verwendeten Daten sind Tabelle 38 entnommen.

Zunächst fällt auf, dass die Melatonin-Konzentrationen bei älteren Frauen bis auf die Zeitpunkte 17 Uhr und 20 Uhr dauerhaft über denen der älteren Männer liegen. Bei den älteren Männern tritt die niedrigste Konzentration um 18 Uhr mit einem Wert von $8,04 \pm 9,94$ pg/ml auf. Im Zeitraum von 19 bis 23 Uhr schwankt der Melatoninspiegel in dieser Gruppe in einem relativ engen Bereich zwischen 12,56 und 19,93 pg/ml. Erst am späteren Abend, zwischen 23 und 24 Uhr steigt die Konzentration deutlich an und erreicht einen Wert von $20,50 \pm 29,08$ pg/ml. Auch bei den älteren Frauen findet sich der niedrigste Melatonin-Wert in den frühen Abendstunden. Allerdings kann man hier auch schon vor Erreichen des Maximums um 23 Uhr mehrere stärkere Schwankungen in der Konzentration erkennen. So wird beispielsweise um 19 Uhr ein Wert von 20,90 pg/ml erreicht. Dies entspricht fast einer Verdopplung gegenüber dem Minimalwert, der nur zwei Stunden vorher vorliegt. Bereits eine Stunde später fällt der Wert wiederum auf ein Niveau ab, das knapp über dem Minimum liegt. Diese stündlichen Schwankungen erfolgen bis zum Messzeitende um 24 Uhr. Eine Überprüfung der Variablen-Werte auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test

zeigte, dass einzig die Werte von 22 Uhr und 23 Uhr normalverteilt sind. Alle anderen Werte sind nicht normalverteilt. Der Mittelwertvergleich fand deshalb mit dem U-Test nach Mann und Whitney statt. Die Geschlechtsunterschiede erwiesen sich als statistisch nicht signifikant (Tab. 51).

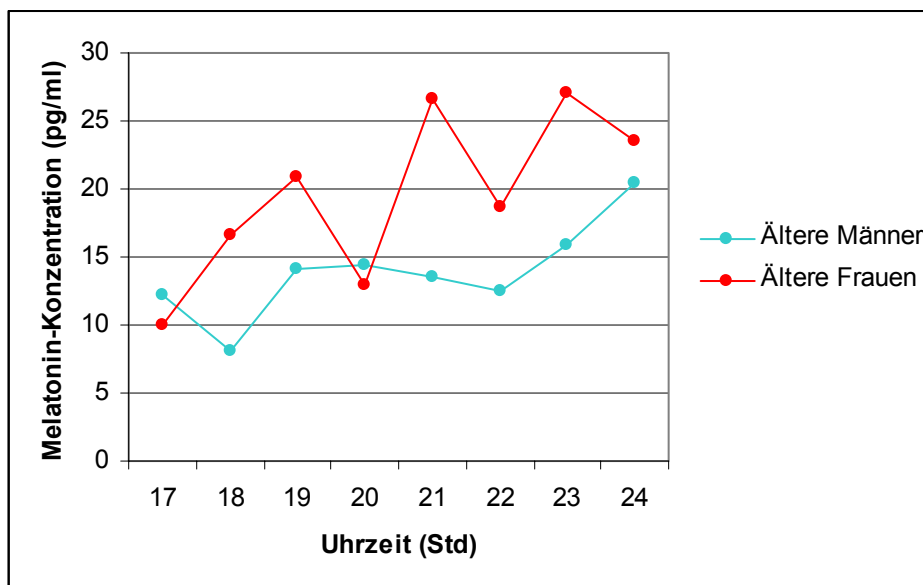


Abb. 61: Vergleich der abendlichen Melatonin-Konzentrationen bei 14 älteren Männern und 20 älteren Frauen. Die beobachteten Geschlechtsunterschiede sind zu keinem Messzeitpunkt statistisch signifikant ($p > 0,05$)

Tab. 51: Mittelwertvergleiche des Melatonin-Abendprofils von 14 älteren Männern und 20 älteren Frauen

Variable	U-Test	
	Z	p
Melatonin (pg/ml) - T17 Uhr	-0,28	0,796
Melatonin (pg/ml) - T18 Uhr	-0,32	0,769
Melatonin (pg/ml) - T19 Uhr	-0,46	0,666
Melatonin (pg/ml) - T20 Uhr	-0,07	0,959
Melatonin (pg/ml) - T21 Uhr	-0,49	0,641
Melatonin (pg/ml) - T22 Uhr	-0,53	0,616
Melatonin (pg/ml) - T23 Uhr	-0,91	0,377
Melatonin (pg/ml) - T24 Uhr	-0,88	0,396

Z = Prüfgröße; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

Dim Light Melatonin Onset (DLMO)

Die DLMO-Werte älterer Männer und Frauen finden sich in der Tabelle 39. Die Abbildung 62 stellt die Werte graphisch dar. Ein Test nach Kolmogorov-Smirnov zeigte, dass die DLMO-Werte der älteren Frauen keiner Normalverteilung unterliegen (Anhang A15). Um zu testen, ob die DLMO-Mittelwerte in diesen beiden Gruppen statistisch signifikante Zusammenhänge zeigen, wurde deshalb der U-Test nach Mann und Whitney verwendet. Es zeigte sich, dass keine statistisch signifikanten Unterschiede auftraten (Tab. 52).

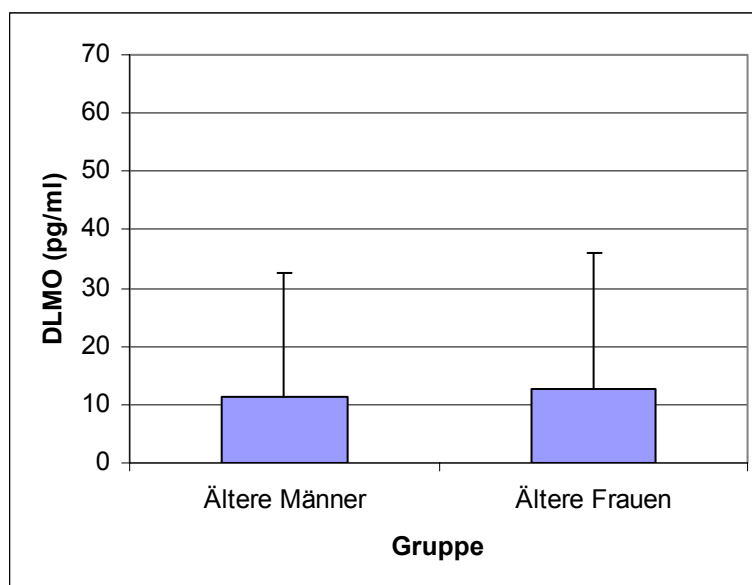


Abb. 62: Vergleich der mittleren DLMO-Werte von 14 älteren Männern und 20 älteren Frauen. Die Geschlechtsunterschiede sind statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$)

Tab. 52: Mittelwertvergleiche des DLMOs von 14 älteren Männern und 20 älteren Frauen

Variable	U-Test	
	Z	p
DLMO (pg/ml)	-1,408	0,169

Z = Prüfgröße; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

4.3.2.5 Vergleich der tageszeitlichen Expressionsprofile der Uhrengene *hBMAL1* und *hPer1* von älteren Männern und Frauen

Im nachfolgenden Teil dieser Arbeit sollen die Expressionsraten der Uhrengene *hBMAL1* und *hPER1* von älteren Männern und Frauen miteinander verglichen werden.

Expressionsprofile des Uhrengens *hBMAL1*

Die Abbildung 63 zeigt das Expressionsprofil des Gens *hBMAL1* von älteren Männern und Frauen über einen Zeitraum von 16 Stunden als Säulendiagramm. Die Werte entstammen der Tabelle 40.

Das Uhrigen *hBMAL1* wird an jedem der untersuchten Zeitpunkte bei älteren Frauen stärker exprimiert als bei älteren Männern. Im Zeitraum von acht bis 16 Uhr steigt die Expression in beiden Gruppen an. Ab dann verlaufen die Expressionsraten jedoch unterschiedlich. Während in der Gruppe der älteren Männer um 16 Uhr das Expressions-Maximum erreicht ist und die Werte bis 24 Uhr fast wieder auf den morgendlichen Minimalwert absinken, steigt die Expression des bei den älteren Frauen weiterhin deutlich an. Hier ist der Anstieg deutlich größer. Dies äußert sich im Zeitraum von 20 bis 24 Uhr in einer Versechsfachung der Expressionsrate. Die Überprüfung der Mittelwerte mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test ergab, dass in der Gruppe der älteren Männer alle Werte normalverteilt sind. In der Gruppe der älteren Frauen sind die Werte von 22 und 24 Uhr jedoch nicht normalverteilt (Anhang A15). Der Mittelwertvergleich der Gen-Ratios von acht, zwölf, 16 und 20 Uhr erfolgte deshalb mit dem t-Test für unverbundene Stichproben (Tab. 53), der Mittelwertvergleich der Ratios von 22 und 24 Uhr erfolgte mittels des U-Tests nach Mann und Whitney (Tab. 54). Diese Unterschiede sind jedoch statistisch nicht signifikant (Tab. 53, Tab. 54).

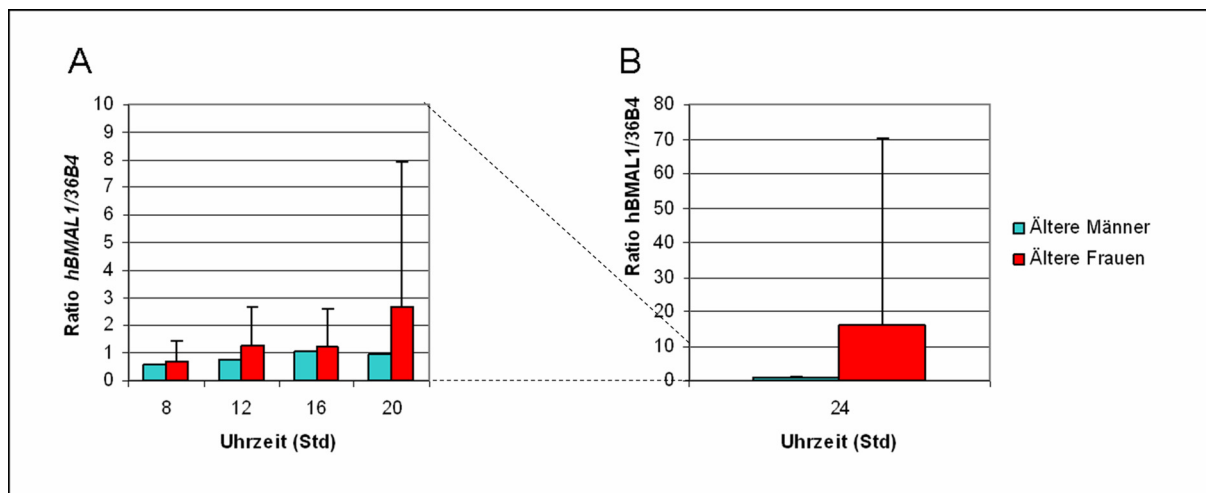


Abb. 63: Vergleich des Expressionsprofils des Uhrengens *hBMAL1* von elf älteren Männern und 13 älteren Frauen. Dargestellt sind die mittleren Ratios von *hBMAL1* zu dem Haushaltsgen *h36B4* im Abstand von jeweils vier Stunden. Der 24-Uhr-Wert der älteren Frauen ist wesentlich höher, als alle weiteren Werte. Um die Aussagekraft der Werte zwischen acht und 20 Uhr nicht zu verringern, wurde der 24-Uhr-Wert einzeln in B dargestellt. Die Einteilung der Ordinate ist dementsprechend eine andere. Der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung an. A: Zeitraum von acht bis 20 Uhr mit Ordinate von Null bis Zehn. B: Zeitpunkt 24 Uhr mit Ordinate von Null bis 80

Tab. 53: Gruppenvergleiche des Expressionsprofils des Uhrengens *hBMAL 1* von elf älteren Männern und 13 älteren Frauen. Verglichen wurde die Expression zu den Zeitpunkten 8, 12, 16 und 20 Uhr. Es wurde der t-Test für unverbundene Stichproben angewandt

Variable	Levene-Test		t-Test	
	F	p	t	p
<i>hBMAL1/h36B4</i> - 08 Uhr	0,01	0,946	-0,33	0,744
<i>hBMAL1/h36B4</i> - 12 Uhr	2,32	0,142	-1,19	0,249
<i>hBMAL1/h36B4</i> - 16 Uhr	4,97	0,036	-0,37	0,716
<i>hBMAL1/h36B4</i> - 20 Uhr	3,10	0,092	-1,04	0,310

F= Prüfgröße im Levene-Test; t = Prüfgröße im t-Test; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

Tab. 54: Gruppenvergleiche der Expressionsprofile des Uhrengens *hBMAL 1* von elf älteren Männern und 13 älteren Frauen. Verglichen wurde die Expression zu den Zeitpunkten 22 und 24 Uhr. Es wurde der U-Test nach Mann und Whitney angewendet

Variable	U-Test	
	Z	p
<i>hBMAL1/h36B4</i> - 22 Uhr	-0,67	0,531
<i>hBMAL1/h36B4</i> - 24Uhr	-1,13	0,277

Z = Prüfgröße; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

Expressionsprofile des Uhrengens *hPER1*

Den Expressionsverlauf des Uhrengens *hPER1* für ältere Männer und Frauen zeigt Abbildung 64. Erfasst wurde wieder der Zeitraum zwischen acht Uhr morgens und 24 Uhr. Mittelwerte sind der Tabelle 40 entnommen.

Die Expression dieses Uhrengens verläuft bei den beiden Geschlechtern unterschiedlich. Bei den älteren Männern zeigt sich um acht Uhr morgens mit einer Ratio von 0,54 das Minimum. Von hier aus steigt die Expression bis um 16 Uhr an und bleibt über mehrere Stunden konstant auf einer Höhe von 0,86. In den nachfolgenden Stunden sinkt die Expressionsrate langsam ab. Die älteren Frauen zeigen in ihrer minimalen Expression (0,50) einen ähnlichen Wert wie die älteren Männer. Allerdings wird das Minimum bei Frauen erst zwischen zwölf und 16 Uhr erreicht. Ab diesem Zeitpunkt steigt die Expression bis zum Messzeitende um 24

Uhr durchgehend an und erreicht somit um 24 Uhr ihr Maximum mit einem Wert von 0,81. Die Geschlechtsunterschiede erwiesen sich als statistisch nicht signifikant (Tab. 55).

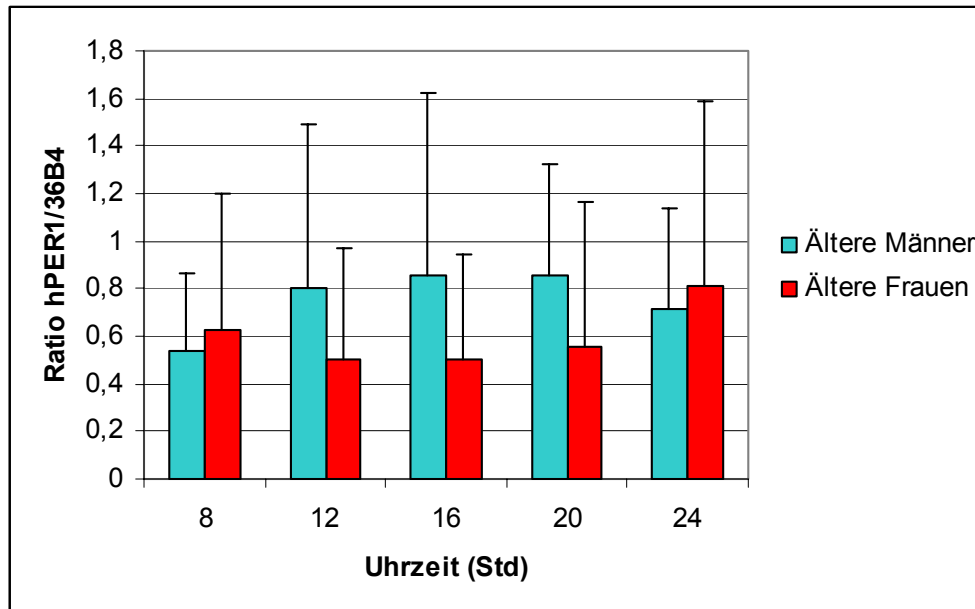


Abb. 64: Vergleich des Expressionsprofils des Uhrengens *hPER1* von zehn älteren Männern und 12 älteren Frauen. Dargestellt sind die mittleren Ratios von *hPER1* zu dem Haushaltsgen *h36B4* im Abstand von jeweils vier Stunden. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Tab. 55: Gruppenvergleiche der Expressionsprofile des Uhrengens *hPER 1* von zehn älteren Männern und 12 älteren Frauen. Es wurde der t-Test für unverbundene Stichproben angewendet

Variable	Levene-Test		t-Test	
	F	p	t	p
<i>hPER1/h36B4</i> - 08 Uhr	2,66	0,119	-0,40	0,691
<i>hPER1/h36B4</i> - 12 Uhr	1,00	0,330	1,23	0,234
<i>hPER1/h36B4</i> - 16 Uhr	6,65	0,018	1,31	0,213
<i>hPER1/h36B4</i> - 20 Uhr	0,78	0,388	1,29	0,212
<i>hPER1/h36B4</i> - 22 Uhr	1,73	0,203	-0,04	0,972
<i>hPER1/h36B4</i> - 24 Uhr	3,30	0,084	-0,36	0,722

F= Prüfgröße im Levene-Test; t = Prüfgröße im t-Test; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

4.3.3 Kriterium Schlafqualität

Um Unterschiede in circadianen Markersystemen aufzeigen zu können, die mit der Schlafqualität der Probanden im Zusammenhang stehen, werden die Untersuchungsergebnisse der älteren Probanden im folgenden Teil nach dem Kriterium Schlafqualität unterteilt dargestellt. Die Vergleiche erfolgten separat für Männer und Frauen, da für einige Variablen im vorhergehenden Teil erhebliche Unterschiede zwischen den Geschlechtern nachgewiesen wurden. So entstehen hier vier Vergleichsgruppen: ältere Männer mit guter Schlafqualität, ältere Männer mit schlechter Schlafqualität, ältere Frauen mit guter Schlafqualität und ältere Frauen mit schlechter Schlafqualität.

4.3.3.1 Vergleich der körperlichen Aktivität von guten und schlechten Schläfern

Zunächst wird die körperliche Aktivität der Probanden verglichen. Es gibt in der Literatur Hinweise darauf, dass körperliche Aktivität einen Einfluss auf die Schlafqualität haben kann. Deshalb findet dieser Vergleich zwischen diesen Gruppen statt, wurde in den vorhergehenden Kapiteln aber nicht durchgeführt.

Bei dem Vergleich der körperlichen Aktivität zwischen guten und schlechten Schläfern (Tab. 56) fällt auf, dass sowohl bei den älteren weiblichen Probandinnen als auch bei den älteren männlichen Probanden die Gruppe mit der schlechten Schlafqualität die höhere körperliche Gesamtaktivität aufweist. Die Gesamtaktivität setzt sich zusammen aus der Summe von Basis- und Freizeitaktivitäten sowie dem Sport. Die anteilige Verteilung ist innerhalb der Probandengruppen verschieden. Bei den Männern und den älteren schlechten Schläferinnen wird der höchste MET-Wert innerhalb der Basisaktivitäten erreicht. Bei den Männern machen die Basisaktivitäten mehr als die Hälfte der Gesamtaktivität aus. In den genannten Gruppen wird der zweithöchste Wert innerhalb der Freizeitaktivitäten erlangt. Innerhalb der guten älteren Schläferinnen wird kommt hingegen fast die Hälfte der Gesamtaktivität durch Freizeitaktivitäten zustande. Der zweithöchste MET-Wert wird hier durch den Sport erreicht.

Tab. 56: Körperliche Aktivität von guten und schlechten Schläfern

	N	Basisaktivitäten (MET)		Freizeitaktivitäten (MET)		Sport (MET)		Gesamtaktivität (MET)	
		M	S	M	S	M	S	M	S
Ältere Männer, gute Schläfer	9	37,03	24,31	14,37	12,05	7,79	5,75	59,20	28,02
Ältere Männer, schlechte Schläfer	5	65,50	88,78	40,00	59,27	13,55	17,10	119,05	99,74
Ältere Frauen, gute Schläfer	9	14,29	12,30	30,31	33,71	20,44	22,11	65,15	30,77
Ältere Frauen, schlechte Schläfer	11	41,21	37,19	34,09	34,49	21,67	22,28	96,97	60,73

M = Mittelwert; S = Standardabweichung

Obwohl für die vorliegenden Variablen mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests eine Normalverteilung nachgewiesen werden konnte (Anhang A15), wurde aufgrund der geringen Stichprobengröße für den Mittelwertvergleich auf den U-Test nach Mann-Whitney zurückgegriffen (Tab. 57). In der Gruppe der älteren Frauen liegt der Unterschied in den Basisaktivitäten von guten und schlechten Schläferinnen an der Signifikanzgrenze ($p = 0,056$), aber es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

Tab. 57: Gruppenvergleiche zwischen der körperlichen Aktivität von guten und schlechten Schläfern. Bei den älteren Männern handelte es sich um fünf schlechte und neun gute Schläfer, bei den Frauen um elf schlechte und neun gute Schläferinnen.

Variable	Ältere Männer		Ältere Frauen	
	U-Test		U-Test	
	Z	p	Z	p
Gesamtaktivität (MET)	-0,47	0,699	-1,18	0,261
Basisaktivitäten (MET)	-0,20	0,898	-1,94	0,056
Freizeitaktivitäten (MET)	-0,67	0,518	-0,34	0,766
Sport (MET)	-0,27	0,797	-0,19	0,882

Z = Prüfgröße; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

4.3.3.2 Vergleich der Körperkerntemperatur-Profile von guten und schlechten Schläfern

Unterteilt man die beiden älteren Probandengruppen in gute und schlechte Schläfer, so lassen sich Unterschiede in den mittleren Körperkerntemperatur-Verläufen zwischen den guten und schlechten Schläfern beobachten (Tab. 58). Die Daten aus der Tabelle 58 sind in den Abbildungen 65 und 66 graphisch dargestellt

Tab. 58: Körperkerntemperatur-Verläufe von älteren Probanden mit unterschiedlichen Schlafqualitäten

Uhrzeit (Std)	Körperkerntemperatur (°C)							
	Ältere Männer, gute Schläfer (N=9)		Ältere Männer, schlechte Schläfer (N=5)		Ältere Frauen, gute Schläfer (N=9)		Ältere Frauen, schlechte Schläfer (N=11)	
	M	S	M	S	M	S	M	S
8	35,89	0,57	35,47	0,66	36,03	0,42	36,06	0,38
12	36,32	0,35	35,88	0,44	36,37	0,41	35,97	0,44
16	36,42	0,45	35,78	0,53	36,57	0,25	36,21	0,41
17	36,41	0,39	36,14	0,28	36,69	0,26	36,48	0,20
18	36,42	0,33	36,09	0,30	36,51	0,23	36,43	0,24
19	36,47	0,33	36,08	0,34	36,58	0,16	36,49	0,20
20	36,39	0,23	36,29	0,36	36,49	0,26	36,34	0,23
21	36,20	0,27	36,20	0,26	36,30	0,32	36,22	0,29
22	36,10	0,24	36,04	0,29	36,21	0,39	36,04	0,24
23	36,02	0,29	35,94	0,41	36,03	0,34	35,89	0,18
24	35,92	0,31	35,81	0,35	35,96	0,33	35,81	0,28

M=Mittelwert; S=Standardabweichung

Die Unterschiede beziehen sich weniger auf die Verlaufsform, als vielmehr auf die Höhe der Werte. Die Gruppe der älteren guten Schläferinnen ist diejenige mit den höchsten Temperatur-Werten. Die Werte dieser Kurve liegen zu allen Zeitpunkten über denen der anderen drei Gruppen. Der mittlere Maximalwert von $36,69 \pm 0,26^\circ\text{C}$ wird um 17 Uhr erreicht, und ist der höchste Wert, der hier zu finden ist. Die Kurve der älteren schlechten Schläferinnen beginnt um acht Uhr morgens fast mit der selben Temperatur ($36,06 \pm 0,38^\circ\text{C}$), mit der auch die Kurve der guten Schläferinnen beginnt ($36,03 \pm 0,42^\circ\text{C}$). Während die Kurve der guten älteren Schläferinnen jedoch kontinuierlich bis 17 Uhr steigt, sinkt die Kurve der schlechten Schläferinnen im Zeitraum von acht bis zwölf Uhr leicht ab, nämlich bis auf $35,97 \pm 0,44^\circ\text{C}$. Dann steigt sie jedoch auch bis um 17 Uhr wieder an.

Bei den älteren Männern zeigt sich ein ähnliches Bild. Die Kurve der guten Schläfer liegt bereits zu Beginn der Messreihe um acht Uhr morgens mit einem Wert von $35,89 \pm 0,57^\circ\text{C}$ deutlich über dem Wert der männlichen schlechten Schläfer, die zu diesem Zeitpunkt eine mittlere Körperkerntemperatur von $35,47 \pm 0,66^\circ\text{C}$ aufweisen. Die Kurve der guten Schläfer steigt bis um 16 Uhr an. Bei den männlichen schlechten Schläfern steigt sie bis um zwölf Uhr mittags an, sinkt dann aber bis um 16 Uhr wieder ab, um dann bis um 17 Uhr wieder zu steigen. Die älteren männlichen Schläfer mit guter Schlafqualität erreichen ihr Körperkerntemperatur-Maximum um 19 Uhr mit einem Wert von $36,47 \pm 0,33^\circ\text{C}$, die schlechten Schläfer um 20 Uhr mit $36,29 \pm 0,36^\circ\text{C}$.

Es fällt auf, dass die Werte der vier Gruppen zunächst relativ weit auseinander liegen, ab etwa 20 Uhr jedoch eine deutliche Annäherung erkennbar ist. Während beispielsweise im

Ergebnisse

Zeitraum von acht bis 20 Uhr die Werte der weiblichen guten Schläferinnen stets über denen der guten männlichen Schläfer liegen, sowie die Werte der schlechten weiblichen Schläferinnen über denen der schlechten männlichen Schläfer, gilt dies ab etwa 20 Uhr nicht mehr. Die Temperatur-Werte liegen sehr dicht beieinander.

Aufgrund der niedrigen Probandenzahlen in den Gruppen wurden die mittleren Temperaturwerte mit Hilfe des U-Tests nach Mann und Whitney auf statistisch signifikante Zusammenhänge untersucht (Tab. 59) Bei den älteren Männern unterschieden sich die Werte der guten Schläfer und die der schlechten Schläfer um 16 Uhr und um 18 Uhr signifikant voneinander (Abb. 65).

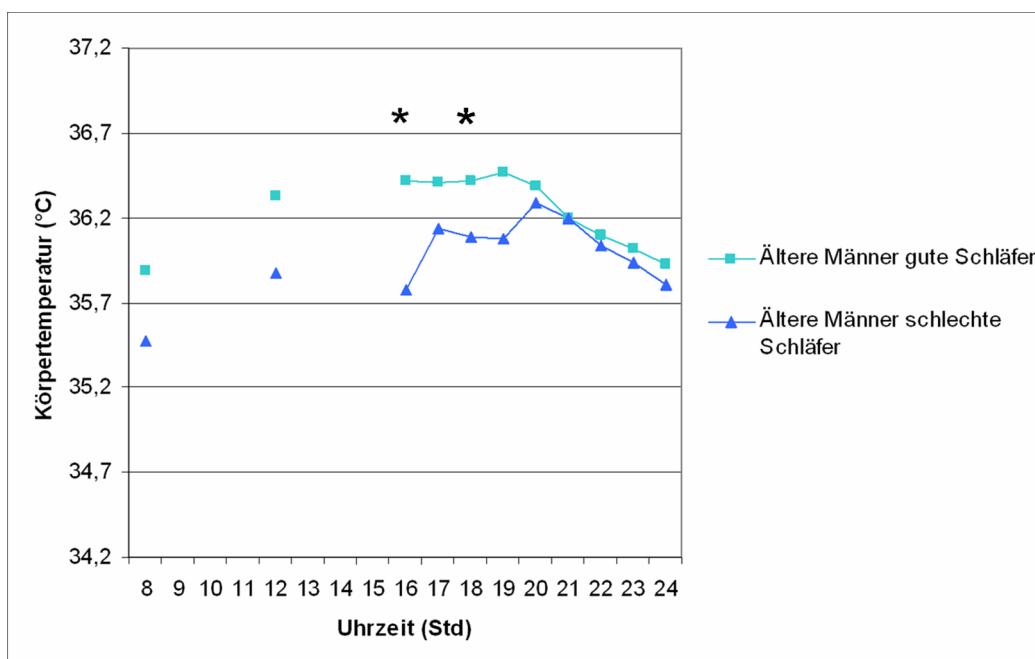


Abb. 65: Verlauf der Körperkerntemperatur bei älteren männlichen Probanden mit guter bzw schlechter Schlafqualität im Zeitraum von 8 Uhr bis 24 Uhr. Sternchen kennzeichnen statistisch signifikante Werte

In der Gruppe der älteren Probandinnen traten keine statistisch signifikanten Mittelwertunterschiede zwischen den Körperkerntemperatur-Werten von guten bzw. schlechten Schläferinnen auf (Abb. 66).

Ergebnisse

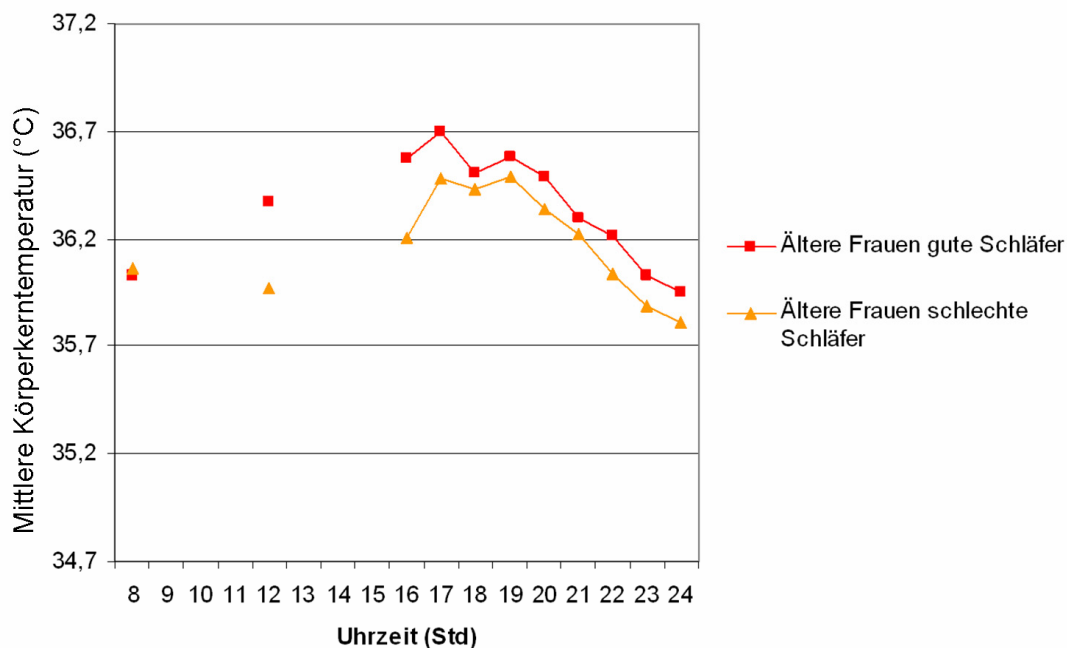


Abb. 66: Verlauf der Körperkerntemperatur bei älteren guten und schlechten Schläferinnen im Zeitraum von 8 Uhr bis 24 Uhr. Sternchen kennzeichnen statistisch signifikante Werte

Tab. 59: Vergleich des Verlaufs der Körperkerntemperatur von guten und schlechten Schläfern. Bei den älteren Männern handelte es sich um fünf schlechte und neun gute Schläfer, bei den Frauen um elf schlechte und neun gute Schläferinnen

Variable	Ältere Männer		Ältere Frauen	
	U-Test		U-Test	
	Z	p	Z	p
Körperkerntemperatur- 8 Uhr	-1,27	0,240	-0,04	1,000
Körperkerntemperatur-12 Uhr	-1,87	0,060	-1,94	0,056
Körperkerntemperatur-16 Uhr	-2,07	0,042	-1,34	0,201
Körperkerntemperatur-17 Uhr	-1,69	0,112	-1,34	0,201
Körperkerntemperatur-18 Uhr	-2,08	0,042	-0,42	0,710
Körperkerntemperatur-19 Uhr	-1,94	0,060	-0,99	0,331
Körperkerntemperatur-20 Uhr	-0,27	0,797	-1,11	0,295
Körperkerntemperatur-21 Uhr	-0,13	0,898	-0,84	0,412
Körperkerntemperatur-22 Uhr	< 0,00	1,000	-0,23	0,824
Körperkerntemperatur-23 Uhr	-0,27	0,797	-1,33	0,201
Körperkerntemperatur-24 Uhr	-0,67	0,518	-0,84	0,412

4.3.3.3 Vergleich der Cortisol-Morgenprofile und CAR von guten und schlechten Schläfern

Cortisol-Aufwach-Konzentrationen

Tabelle 60 und Abbildung 67 zeigen die Cortisol-Aufwach-Konzentrationen von guten und schlechten Schläfergruppen.

Tab. 60: Mittelwert und Standardabweichung der Cortisol-Aufwachkonzentration bei guten und schlechten Schläfern

	N	Cortisol-Aufwachkonzentration ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	
		M	S
Ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,40	0,16
Ältere Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,35	0,06
Ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,32	0,10
Ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	0,37	0,15

M=Mittelwert; S=Standardabweichung

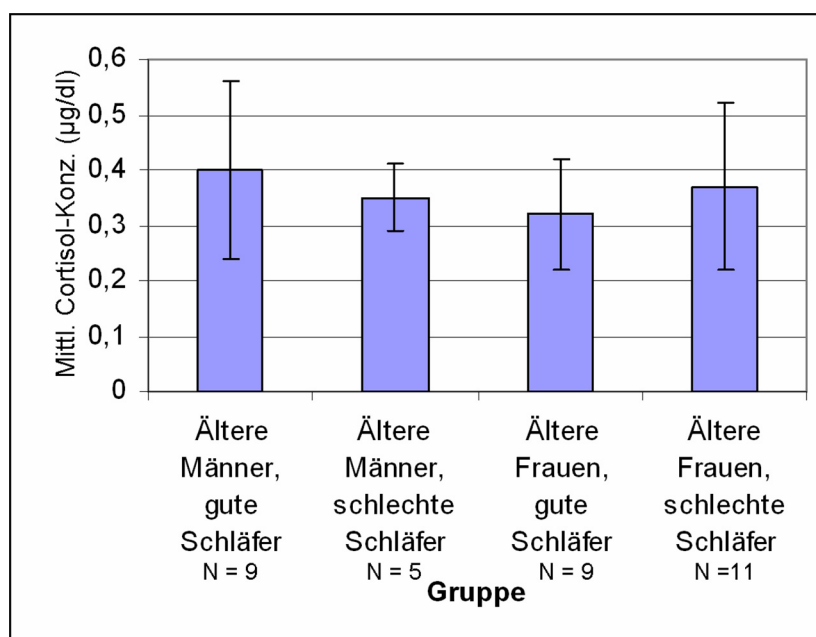


Abb. 67: Cortisol-Aufwachkonzentration bei guten und schlechten Schläfern. Gezeigt ist die mittlere Cortisol-Aufwachkonzentration der Probanden in den verschiedenen Schläfergruppen. Die Fehlerbalken stellen die doppelte Standardabweichung dar.

Der höchste Mittelwert der Cortisol-Konzentration wird in der Gruppe der älteren männlichen Probanden mit guter Schlafqualität erreicht. Diese Gruppe zeigt zum Zeitpunkt des Erwachens im Mittel eine Cortisol-Konzentration von $0,40 \pm 0,16 \mu\text{g}/\text{dl}$. Die männlichen Probanden mit der schlechten Schlafqualität erreichen einen niedrigeren Wert von $0,35 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{dl}$. Dieser Wert liegt sehr dicht bei der Cortisol-Konzentration der älteren

Probandinnen mit schlechter Schlafqualität. In dieser Gruppe findet sich eine Cortisol-Speichelkonzentration von $0,37 \pm 0,15 \mu\text{g/dl}$. Anders als bei den männlichen Probanden, ist die Cortisol-Konzentration bei den älteren weiblichen Probandinnen in der Gruppe der schlechten Schläferinnen höher als in der Gruppe der guten Schläferinnen. Letztgenannte zeigen mit einem Wert von $0,32 \pm 0,10 \mu\text{g/dl}$ die niedrigste Cortisolkonzentration in ihrem Speichel. Die Werte wurden mit Hilfe des U-Tests nach Mann-Whitney auf statistisch signifikante Zusammenhänge untersucht. Die Unterschiede zwischen guten und schlechten Schläfern erwiesen sich sowohl bei den Männern als auch bei den Frauen als statistisch nicht signifikant (Tab. 62).

Cortisol-Morgenprofile

Die Cortisol-Morgenprofile in den nach guten und schlechten Schläfern unterteilten Probandengruppen zeigt Tabelle 61.

Tab. 61: Mittlere morgendliche Cortisol-Konzentrationen von älteren Männern und Frauen mit guter bzw. schlechter Schlafqualität innerhalb der ersten 60 min. nach dem Erwachen

	N	Zeitpunkt nach dem Erwachen (min)									
		0		15		30		45		60	
		Cortisol-Konzentration ($\mu\text{g/dl}$)		Cortisol-Konzentration ($\mu\text{g/dl}$)		Cortisol-Konzentration ($\mu\text{g/dl}$)		Cortisol-Konzentration ($\mu\text{g/dl}$)		Cortisol-Konzentration ($\mu\text{g/dl}$)	
		M	S	M	S	M	S	M	S	M	S
Ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,40	0,16	0,45	0,15	0,62	0,18	0,68	0,27	0,56	0,23
Ältere Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,35	0,06	0,40	0,07	0,40	0,08	0,38	0,13	0,31	0,09
Ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,32	0,10	0,44	0,15	0,53	0,17	0,57	0,22	0,64	0,26
Ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	0,37	0,15	0,45	0,17	0,53	0,19	0,51	0,16	0,46	0,17

M = Mittelwert; S = Standardabweichung

Zwar beginnen die Werte in allen Gruppen mit einer ähnlichen Cortisolkonzentration, aber sowohl der Verlauf der Cortisol-Synthese als auch die maximal erreichten Werte sind unterschiedlich. Die Werte der älteren Männer mit guter Schlafqualität steigen vom

Ergebnisse

Erwachen bis 45 Minuten danach deutlich an. Zu diesem Zeitpunkt ist hier eine Cortisol-Konzentration von etwa 0,68 µg/dl erreicht. Danach sinken die Werte wieder deutlich ab. Der Konzentrationsanstieg der männlichen schlechten Schläfer verläuft hingegen wesentlich langsamer. Während der ersten 15 Minuten nach dem Erwachen steigt die Konzentration leicht an, erreicht dann auch ihr Maximum und fällt schließlich wieder ab. Eine Stunde nach dem Erwachen liegt der Wert bereits niedriger als während des Aufwachens. Die Unterschiede zwischen den genannten Werten wurden mit dem U-Test nach Mann-Whitney auf signifikante Unterschiede untersucht. Bei den Männern wichen die Mittelwerte der Gruppen 30, 45 und 60 Minuten nach dem Erwachen signifikant voneinander ab. Bei den Frauen waren die Unterschiede der Cortisol-Konzentrationen in den verschiedenen Schläfergruppen 60 Minuten nach dem Erwachen ebenfalls signifikant (Tab. 62). Die Verläufe der Cortisol-Aufwachskonzentrationen bei guten und schlechten Schläfern sind in den Abbildungen 68 und 69 graphisch dargestellt.

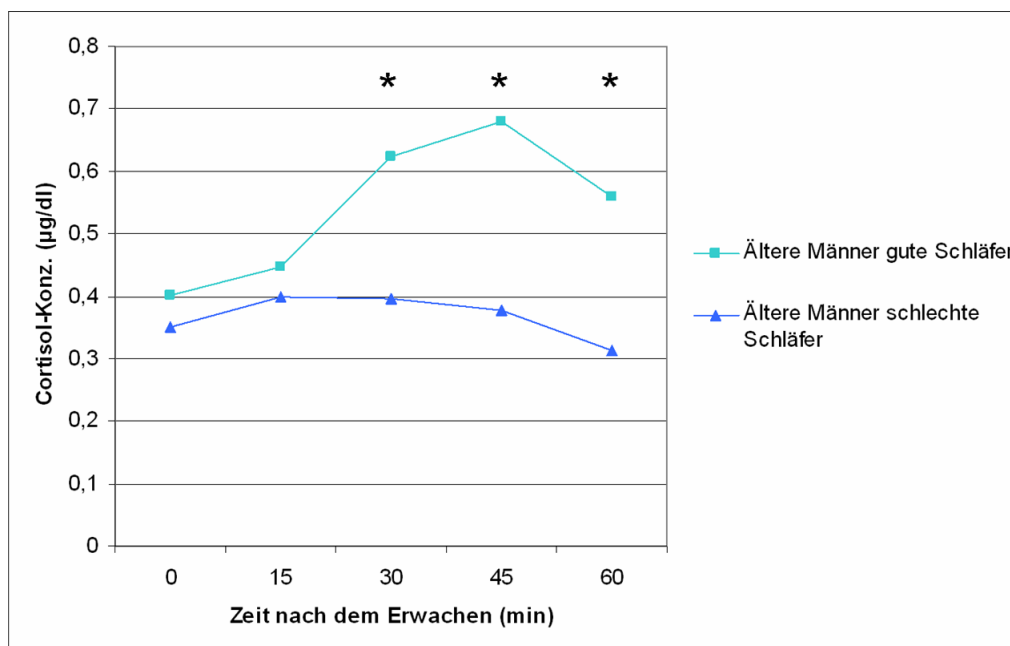


Abb. 68: Cortisol-Morgenprofile der männlichen Probanden unterteilt nach ihrer Schlafqualität. Sternchen kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede

Auch bei den älteren Frauen beginnen die Kurven dicht beieinander (Abb. 69) Während der ersten 30 Minuten nach dem Erwachen verlaufen sie ähnlich und zeigen auch dieselbe Konzentration. Während die Kurve der guten Schläferinnen jedoch weiterhin ansteigt und den höchsten Wert 60 Minuten nach Messbeginn u.U. noch nicht erreicht hat, sinkt die Kurve der älteren schlechten Schläferinnen bereits nach 30 Minuten wieder ab. Diese Unterschiede zwischen älteren guten Schläferinnen und schlechten Schläferinnen waren 60 Minuten nach dem Aufwachen statistisch signifikant (Tab. 62).

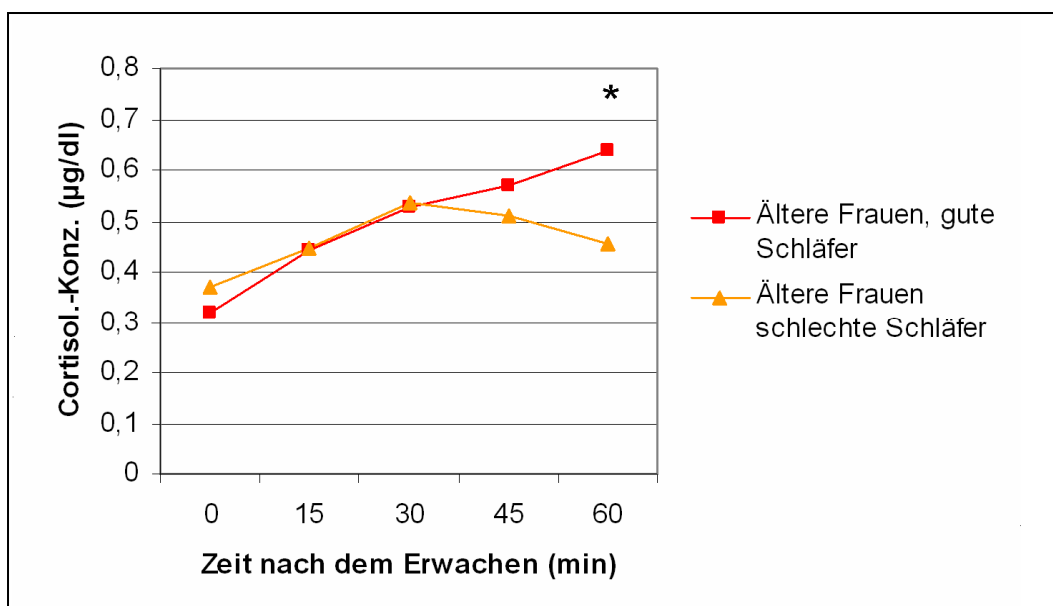


Abb. 69: Cortisol-Morgenprofile der weiblichen Probanden unterteilt nach ihrer Schlafqualität. Das Sternchen kennzeichnet einen statistisch signifikanten Unterschied

Insgesamt verlaufen die Kurven der schlechten Schläfer bei beiden Geschlechtern flacher, zeigen insgesamt niedrigere Konzentrationen und erreichen ihr Maximum früher als die der guten Schläfer.

Tab. 62: Vergleich der mittleren Cortisol-Konzentrationen während der ersten 60 min. nach dem Aufwachen von Männern und Frauen mit guter bzw. schlechter Schlafqualität. Bei den älteren Männern handelte es sich um fünf schlechte und neun gute Schläfer, bei den Frauen um elf schlechte und neun gute Schläferinnen.

Variable	Ältere Männer		Ältere Frauen	
	U-Test		U-Test	
	Z	p	Z	p
Cortisol (µg/dl) - 0 min	-0,33	0,797	-0,65	0,552
Cortisol (µg/dl) - 15 min	-0,33	0,797	-0,11	0,941
Cortisol (µg/dl)- 30 min	-2,33	0,019	-0,34	0,766
Cortisol (µg/dl) -45 min	-2,20	0,029	-0,65	0,552
Cortisol (µg/dl)- 60 min	-2,20	0,029	-2,17	0,031

Z = Prüfgröße; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

Cortisol-Awakening-Response (CAR)

Die CAR-Werte von guten und schlechten Schläfern innerhalb der älteren Probanden, die sich aus Werten des Cortisol-Morgenprofils errechnen, sind in Tabelle 63 dargestellt. Abbildung 70 zeigt die Werte graphisch.

Tab. 63: Vergleich der Cortisol-Awakening-Response (CAR) von guten und schlechten Schläfern

	N	CAR	
		M	S
Ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,65	0,17
Ältere Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,92	0,28
Ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,64	0,19
Ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	0,70	0,16

M = Mittelwert; S = Standardabweichung

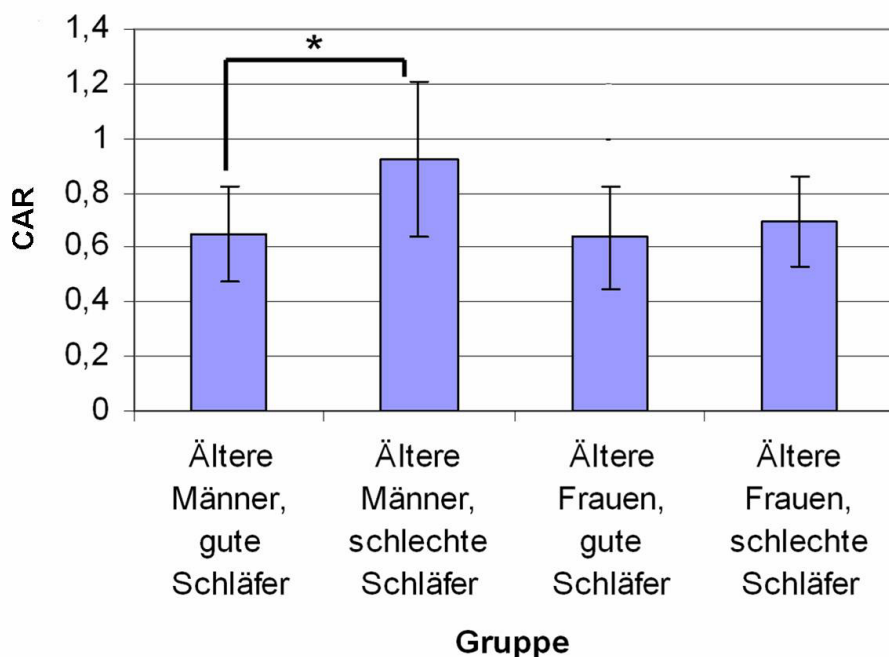


Abb. 70: Vergleich der CAR-Werte bei guten und schlechten Schläfern. Die Mittelwertsunterschiede zwischen den beiden männlichen Probandengruppen sind signifikant ($p = 0,042$). Die eingezeichneten Fehlerbalken stellen die doppelte Standardabweichung dar. Das Sternchen symbolisiert den statistisch signifikanten Mittelwertsunterschied

Wie Abbildung 70 und Tabelle 63 zu entnehmen ist, findet sich der höchste CAR-Wert bei den älteren männlichen Probanden mit schlechter Schlafqualität. In dieser Gruppe hat die CAR einen Wert von $0,92 \pm 0,28$. Ältere Männer und Frauen mit guter Schlafqualität liegen

mit Werten von $0,65 \pm 0,17$ bzw. $0,64 \pm 0,19$ sehr dicht beieinander. Die Gruppe der älteren Frauen mit schlechter Schlafqualität zeigt einen Wert von $0,70 \pm 0,16$. Somit weisen sowohl bei den älteren männlichen Probanden als auch bei den älteren weiblichen Probandinnen jeweils die Untergruppen mit der schlechteren Schlafqualität den höheren CAR-Wert auf. Diese Unterschiede sind nur für Männer statistisch signifikant (Tab. 64).

Tab. 64: Mittelwert-Vergleich der CAR-Werte von guten und schlechten Schläfern. Bei den älteren Männern handelte es sich um fünf schlechte und neun gute Schläfer, bei den Frauen um elf schlechte und neun gute Schläferinnen

Variable	Ältere Männer		Ältere Frauen	
	U-Test		U-Test	
	Z	p	Z	p
CAR	-2,07	0,042	-1,10	0,295

Z = Prüfgröße; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

4.3.3.4 Vergleich der Melatonin-Abendprofile und DLMO von guten und schlechten Schläfern

Melatonin-Abendprofile

Die Melatonin-Konzentrationen von 17 bis 24 Uhr der älteren Probanden zeigt Tabelle 65 separat für die Schläfergruppen. Diese Werte wurden verwendet, um Melatonin-Abendprofile von den vier Probandengruppen zu erstellen. Diese sind in Abbildung 72 dargestellt. Man kann erkennen, dass die Melatonin-Konzentration in allen vier Probandengruppen im Zeitraum von 17 Uhr bis 24 Uhr steigt. Während des gesamten Zeitraums verläuft die Kurve der Männer mit schlechter Schlafqualität unterhalb der Kurven der drei anderen Gruppen. Die Kurve der älteren Frauen mit guter Schlafqualität weist große Schwankungen auf. Während die Melatonin-Konzentration in dieser Gruppe unter der der guten männlichen Schläfer und der weiblichen schlechten Schläfer liegt, verläuft sie um 18, 19, 21, 22,23 und 24 Uhr darüber. Einzig um 20 Uhr sinkt die Kurve stark ab. Das Melatonin-Abendprofil der älteren Frauen mit schlechter Schlafqualität und nd das der älteren Männer mit guter Schlafqualität liegen während des gesamten Messzeitraumes dicht beieinander.

In beiden Männer-Gruppen werden die Konzentrations-Minima um 18 Uhr, und die Konzentrations-Maxima um 24 Uhr erreicht.

Tab 65: Vergleich der abendlichen Melatonin-Konzentrationen von guten und schlechten Schläfern

Uhrzeit (Std)	Melatonin-Konzentration (pg/ml)							
	Ältere Männer, gute Schläfer (N=9)		Ältere Männer, schlechte Schläfer (N=5)		Ältere Frauen, gute Schläfer (N=9)		Ältere Frauen, schlechte Schläfer (N=11)	
	M	S	M	S	M	S	M	S
17	17,14	30,72	3,15	3,51	7,40	10,21	12,14	19,17
18	11,53	11,01	1,75	1,43	19,76	44,41	14,00	26,57
19	20,05	35,88	3,42	3,61	23,13	51,32	19,07	36,30
20	20,01	26,45	4,31	5,39	9,63	7,09	15,61	33,49
21	16,35	17,43	8,63	8,61	28,39	40,36	25,10	51,07
22	14,04	12,51	9,90	8,95	20,28	29,63	17,27	17,45
23	19,45	19,77	9,61	4,94	33,99	56,76	21,44	19,84
24	24,35	36,00	13,57	7,95	25,95	32,83	21,49	16,02

M = Mittelwert; S = Standardabweichung

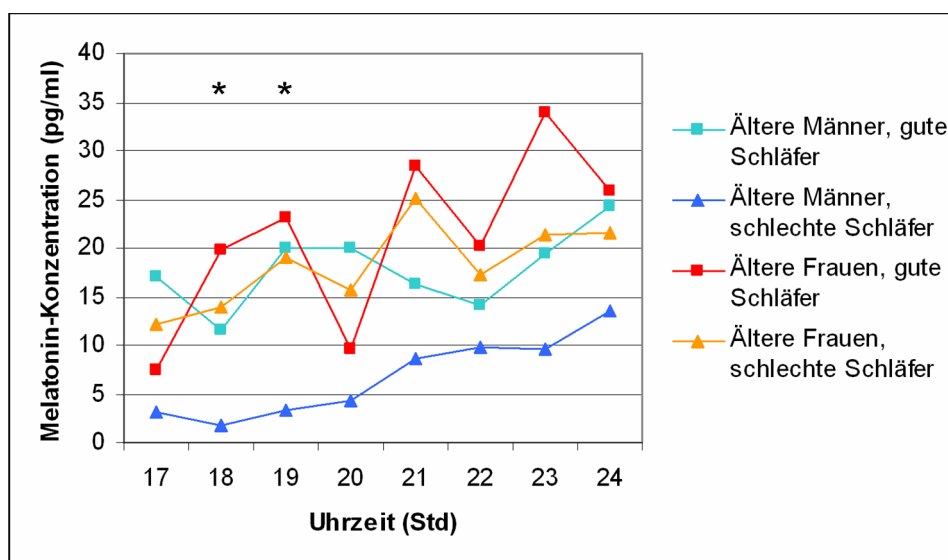


Abb. 71: Vergleich der Melatonin-Abendprofile von guten und schlechten Schläfern. Während bei Frauen keine signifikanten Unterschiede in der Melatonin-Konzentration auftreten, ergeben sich bei den Männern signifikante Unterschiede um 18 und 19 Uhr

Bei den Frauen unterscheiden sich gute und schlechte Schläfer in ihren Melatonin-Konzentrationen zwischen 17 und 24 Uhr nicht signifikant voneinander (Tab. 66). Dagegen treten bei den Männern am frühen Abend (18 und 19 Uhr) signifikante Unterschiede auf. Hierbei zeigen die guten Schläfer höhere Werte als die schlechten Schläfer.

Tab. 66: Vergleich der mittleren Melatonin-Konzentrationen von guten und schlechten Schläfern in den Gruppen ältere Männer und ältere Frauen. Bei den älteren Männern handelte es sich um fünf schlechte und neun gute Schläfer, bei den Frauen um elf schlechte und neun gute Schläferinnen.

Variable	Ältere Männer		Ältere Frauen	
	U-Test		U-Test	
	Z	p	Z	p
Melatonin (pg/ml) - 17 Uhr	-1,67	0,112	-0,49	0,656
Melatonin (pg/ml) - 18 Uhr	-2,20	0,029	-0,04	1,000
Melatonin (pg/ml) - 19 Uhr	-2,07	0,042	-0,11	0,941
Melatonin (pg/ml) - 20 Uhr	-1,67	0,112	-0,87	0,412
Melatonin (pg/ml) - 21 Uhr	-1,13	0,298	-0,95	0,370
Melatonin (pg/ml) - 22 Uhr	-0,73	0,518	-0,04	1,000
Melatonin (pg/ml) - 23 Uhr	-0,47	0,699	-0,19	0,882
Melatonin (pg/ml) - 24 Uhr	-0,20	0,898	-0,04	1,000

Z = Prüfgröße; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

DLMO-Schwellenwert und -Zeitpunkt

Die Tabelle 67 zeigt die Melatoninkonzentrationen, die den Schwellenwert für den DLMO angeben, sowie den Zeitpunkt, an dem diese Konzentrationen im Mittel in den verschiedenen Schläfergruppen erreicht werden. Die mittleren DLMO-Schwellenwerte sind in der Abbildung 72 dargestellt.

Tab. 67: DLMO-Schwellenwert und DLMO-Zeitpunkt von guten und schlechten Schläfern. Bei den älteren Männern handelte es sich um fünf schlechte und neun gute Schläfer, bei den Frauen um elf schlechte und neun gute Schläferinnen.

	N	DLMO-Schwelle (pg/ml)		DLMO-Zeitpunkt (min)	
		M	S	M	S
Ältere Männer, gute Schläfer	9	29,83	52,13	1228,43	35,85
Ältere Männer, schlechte Schläfer	5	5,70	5,74	1199,40	41,22
Ältere Frauen, gute Schläfer	9	28,00	61,14	1197,13	38,65
Ältere Frauen, schlechte Schläfer	11	19,51	40,47	1246,88	69,83

DLMO = Dim Light Melatonin Onset; M = Mittelwert; S = Standardabweichung

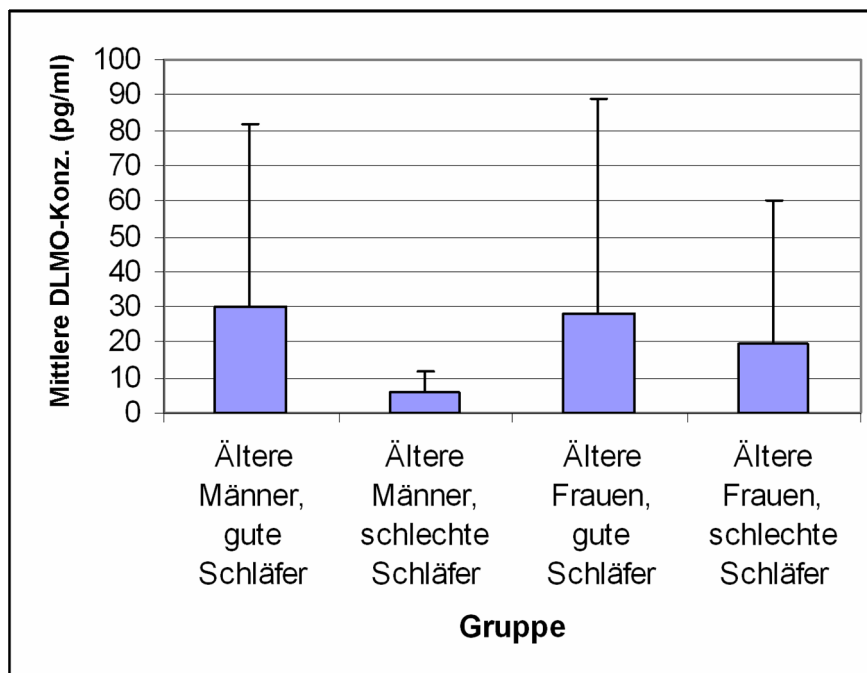


Abb. 72: Vergleich der DLMO-Schwellenwerte von guten und schlechten Schläfern. Ältere Männer: fünf schlechte und neun gute Schläfer; ältere Frauen: elf schlechte und neun gute Schläferinnen. Der Fehlerbalken gibt die Standardabweichungen an.

Bei dem Vergleich von guten und schlechten Schläfergruppen fällt auf, dass die DLMO-Schwellenkonzentrationen bei den schlechten Schläfern wesentlich niedriger sind, als bei den guten Schläfern. Bei älteren Frauen mit schlechter Schlafqualität wird der DLMO schon bei einem Wert von $19,51 \pm 40,47$ pg/ml erreicht. In der Gruppe der älteren Frauen mit guter Schlafqualität hingegen erst bei einer Konzentration von $28,00 \pm 61,14$ pg/ml. Noch stärker ausgeprägt ist dieser Unterschied bei den älteren Männern. Während die gut schlafenden Männer die DLMO-Schwelle erst bei einem Wert von $29,83 \pm 52,13$ pg/ml erreichen, ist dies bei männlichen schlechten Schläfern schon bei einer Konzentration von $5,70 \pm 5,74$ pg/ml der Fall. Damit liegt die DLMO-Schwelle bei den männlichen guten Schläfern mehr als fünf mal so hoch wie bei den männlichen schlechten Schläfern.

Auch der Zeitpunkt, an dem der DLMO-Wert erreicht wird, unterscheidet sich in den verschiedenen Gruppen um fast 50 Minuten. Dies ist bei den älteren Frauen der Fall. So erreichen die älteren Frauen mit guter Schlafqualität ihren DLMO etwa während der 1197. Minute des Tages, d.h. gegen 19:57 Uhr. Die älteren Frauen mit schlechter Schlafqualität erreichen den Wert hingegen erst um 20:46 Uhr. Auch bei den Männern gibt es einen zeitlichen Unterschied. Jedoch ist dieser anders gelagert, da hier die schlechten Schläfer ihren DLMO früher erreichen. Dies geschieht im Mittel fast genau um 20 Uhr. Die Männer mit guter Schlafqualität erreichen diesen Punkt etwa in der 1229. Minute des Tages, also um 20:29 Uhr, und somit circa eine halbe Stunde später als die schlechten Schläfer.

Die Unterschiede zwischen guten und schlechten Schläfern erwiesen sich weder für Männer noch für Frauen als statistisch signifikant (Tab. 68)

Tab. 68: Vergleich der Mittelwerte von DLMO-Schwellenkonzentration und DLMO-Zeitpunkt bei guten und schlechten Schläfern. Ältere Männer: fünf schlechte und neun gute Schläfer; ältere Frauen: elf schlechte und neun gute Schläferinnen.

Variable	Ältere Männer		Ältere Frauen	
	U-Test		U-Test	
	Z	p	Z	p
DLMO-Schwelle (pg/ml)	-1,53	0,147	-0,49	0,656
DLMO-Zeitpunkt (min)	-1,06	0,343	-1,42	0,161

Z = Prüfgröße; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

4.3.3.5 Vergleich der tageszeitlichen Expressionsprofile der Uhrengene *hBMAL1* und *hPer1* von guten und schlechten Schläfern

Expressionsprofil des Uhrengens *hBMAL1*

Die Tabelle 69 zeigt die mittleren Expressionen des Uhrengens *hBMAL1*. Dargestellt sind die Ratios aus dem Zielgen *hBMAL1* und dem Haushaltsgen *h36B4*. Hierbei wurden die Werte der älteren Probanden wieder nach Schlafqualität und Geschlecht getrennt aufgeführt. Die in der Tabelle 69 gezeigten Werte sind in der Abbildung 73 graphisch dargestellt.

Tab. 69: Mittelwerte der Ratios von *hBMAL1* / *h36B4* mit Standardabweichungen bei älteren Probanden mit guter bzw. schlechter Schlafqualität

Uhrzeit	Ratios <i>hBMAL1</i> / <i>h36B4</i>							
	Ältere Männer, gute Schläfer (N=7)		Ältere Männer, schlechte Schläfer (N=4)		Ältere Frauen, gute Schläfer (N=5)		Ältere Frauen, schlechte Schläfer (N=8)	
	M	S	M	S	M	S	M	S
8	0,71	0,68	0,41	0,51	0,66	0,52	0,71	0,86
12	0,87	0,69	0,47	0,33	0,92	0,64	1,49	1,75
16	1,14	0,67	0,94	0,71	0,99	0,90	1,37	1,64
20	1,22	1,13	0,56	0,62	1,30	0,86	3,50	6,69
22	0,70	0,57	0,67	0,62	0,91	0,51	4,13	8,45
24	0,81	0,68	0,39	0,31	1,57	1,24	25,28	69,20

M=Mittelwert; S=Standardabweichung

Es fällt auf, dass an jedem Messzeitpunkt die mittleren Ratios der älteren Frauen mit schlechter Schlafqualität am höchsten sind. Die Ratios der beiden Gruppen mit guter Schlafqualität sind etwa gleich, und die Männer mit schlechter Schlafqualität haben die niedrigste Expressionsrate des Gens *hBmal1*. Weiterhin ist der Verlauf der Expression bei

Männern und Frauen mit guter Schlafqualität sehr ähnlich. Um acht Uhr morgens findet sich das jeweilige Expressions-Minimum. Dann folgt zunächst ein Anstieg bis 20 Uhr. Bei den älteren Männern mit guter Schlafqualität ist hiermit die maximale Expression erreicht. Bei den älteren Frauen mit guter Schlafqualität ist um 20 Uhr fast der maximale Wert erreicht, wobei der 24-Uhr-Wert noch etwas höher liegt.

Bei den älteren männlichen Probanden mit schlechter Schlafqualität hingegen wird das Maximum bereits um 16 Uhr erreicht, und bis um 20 Uhr findet ein starker Abfall der *hBMAL1*-Expression statt. Auch der Expressionsverlauf der älteren Frauen mit schlechter Schlafqualität weicht von dem Verlauf der beiden guten Schläfergruppen ab. Bis auf ein geringes Absinken der Expressionsrate zwischen zwölf und 16 Uhr findet sich eine durchgehende Expressionsrate bis zum Messzeitende um 24 Uhr.

Diese Unterschiede zwischen guten und schlechten Schläfern sind jedoch weder für Männer noch für Frauen statistisch signifikant (Tab. 70).

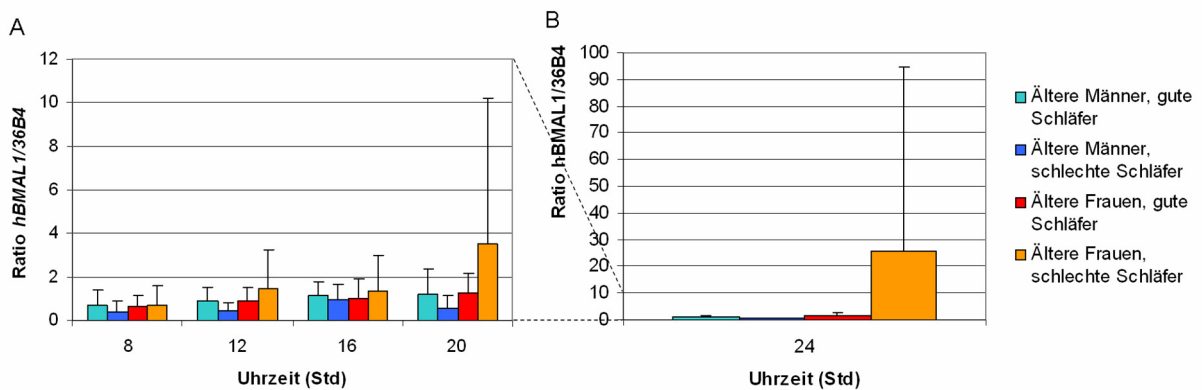


Abb. 73: Vergleich des Expressionsprofils des Uhrengens *hBMAL1* von älteren guten und schlechten Schläfern. Ältere Männer: vier schlechte und sieben gute Schläfer; ältere Frauen: acht schlechte und fünf gute Schläferinnen. Dargestellt sind die mittleren Ratios von *hBMAL1* zu dem Haushaltsgen *h36B4* im Abstand von jeweils vier Stunden. A) Dargestellt ist der Zeitraum von acht Uhr morgens bis 20 Uhr abends. Die Ordinate geht bis zu einer Ratio von zwölf. B) Dargestellt sind die 24-Uhr-Werte. In diesem Fall liegt das Maximum der Ordinate bei einer Ratio von 100. Aufgrund der großen Differenz zwischen dem 24-Uhr-Wert der älteren Frauen mit schlechter Schlafqualität und den anderen Werten wurde für diesen Zeitwert ein eigenes Diagramm erstellt, dessen Ordinate eine andere Einteilung hat als die für die anderen vier Zeitwerte verwendete. Die Unterschiede zwischen guten und schlechten Schläfern sind weder bei Männern noch bei Frauen statistisch signifikant ($p > 0,05$)

Tab. 70: Vergleich der mittleren Expressionsrate von *hBMAL1* bei guten und schlechten Schläfern. Ältere Männer: vier schlechte und sieben gute Schläfer; ältere Frauen: acht schlechte und fünf gute Schläferinnen

Variable	Ältere Männer		Ältere Frauen	
	U-Test		U-Test	
	Z	p	Z	p
<i>hBMAL1/h36B4</i> - 08 Uhr	-0,57	0,648	-0,3	0,724
<i>hBMAL1/h36B4</i> - 12 Uhr	-0,76	0,527	-0,16	0,943
<i>hBMAL1/h36B4</i> - 16 Uhr	-0,38	0,788	0,00	1,000
<i>hBMAL1/h36B4</i> - 20 Uhr	-0,76	0,527	-0,73	0,524
<i>hBMAL1/h36B4</i> - 22 Uhr	-0,19	0,927	-0,59	0,622
<i>hBMAL1/h36B4</i> - 24 Uhr	-1,13	0,315	-1,32	0,222

Z = Prüfgröße; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

Expressionsprofile des Uhrengens *hPER1*

Tabelle 71 zeigt die mittleren Ratios aus dem Zielgen *hPER1* und dem Haushaltsgen *h36B4* dargestellt.

Die in der Tabelle 71 aufgeführten Werte sind in der Abbildung 74 graphisch dargestellt.

Tab. 71: Mittelwerte der Ratios von *hPER1* / *h36B4* mit Standardabweichungen bei guten und schlechten Schläfern

Uhrzeit	Ratios <i>hPER1</i> / <i>h36B4</i>							
	Ältere Männer, gute Schläfer (N=6)		Ältere Männer, schlechte Schläfer (N=4)		Ältere Frauen, gute Schläfer (N=5)		Ältere Frauen, schlechte Schläfer (N=7)	
	M	S	M	S	M	S	M	S
8	0,4	0,33	0,64	0,33	0,77	0,51	0,52	0,63
12	0,97	0,84	0,55	0,30	0,47	0,52	0,52	0,48
16	1,03	0,85	0,60	0,63	0,69	0,58	0,36	0,29
20	0,90	0,58	0,79	0,28	0,47	0,44	0,62	0,73
22	0,75	0,39	0,67	0,42	0,71	0,49	0,73	0,72
24	0,79	0,54	0,60	0,18	0,88	0,72	0,77	0,87

M = Mittelwert; S = Standardabweichung

Auch bei der Betrachtung der Expressionsverläufe des Gens *hPER1* können mehrere Besonderheiten beschrieben werden. In beiden Frauen-Gruppen findet die maximale Expression um 24 Uhr statt. Bei den Männern finden sich die Expressions-Maxima früher, jedoch nicht vor 16 Uhr. Die mittleren Expressions-Minima finden sich früh am Tag. In der Gruppe der weiblichen Probanden mit guter Schlafqualität wird um zwölf und um 20 Uhr der

Ergebnisse

gleiche minimale Wert erreicht. In allen anderen Gruppen tritt das Expressions-Minimum zwischen acht und 16 Uhr auf. Die Unterschiede zwischen guten und schlechten Schläfern sind statistisch nicht signifikant (Tab. 72).

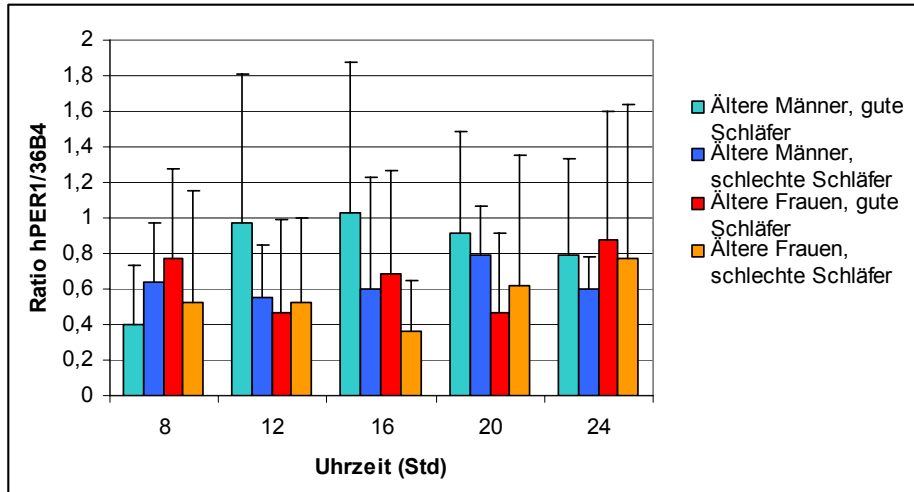


Abb. 74: Vergleich der Expressionsprofile des Uhrengens *hPER1* von Männern und Frauen mit guter bzw. schlechter Schlafqualität. Ältere Männer: sechs gute Schläfer, vier schlechte Schläfer. Frauen: fünf gute Schläfer, sieben schlechte Schläfer. Dargestellt sind die mittleren Ratios von *hPER1* zu dem Haushaltsgen *h36B4* im Abstand von jeweils vier Stunden. Weder bei den Männern noch bei den Frauen ergeben sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen guten und schlechten Schläfern ($p > 0,05$).

Tab. 72: Gruppenvergleiche des Expressionsprofils des Uhrengens *hPER1* bei älteren männlichen und weiblichen Probanden mit guter bzw. schlechter Schlafqualität. Ältere Männer: sechs gute Schläfer, vier schlechte Schläfer. Frauen: fünf gute Schläfer, sieben schlechte Schläfer

Variable	Ältere Männer		Ältere Frauen	
	U-Test		U-Test	
	Z	p	Z	p
<i>hPER1/h36B4</i> - 08 Uhr	-0,85	0,476	-0,83	0,432
<i>hPER1/h36B4</i> - 12 Uhr	-0,64	0,610	-0,41	0,755
<i>hPER1/h36B4</i> - 16 Uhr	-0,64	0,610	-1,06	0,343
<i>hPER1/h36B4</i> - 20 Uhr	-0,21	0,914	-0,08	1,000
<i>hPER1/h36B4</i> - 22 Uhr	-0,54	0,610	-0,33	0,755
<i>hPER1/h36B4</i> - 24 Uhr	-0,32	0,762	-0,41	0,755

Z = Prüfgröße; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

4.4 Zusammenhänge zwischen den untersuchten Variablen

Im nachfolgend dargestellten Teil dieser Arbeit sollen mögliche Zusammenhänge der verschiedenen hier untersuchten Variablen überprüft werden. Dies erfolgt separat für die drei Probandengruppen ältere Männer, ältere Frauen und jüngere Frauen.

4.4.1 Zusammenhänge zwischen Körperkerntemperatur und körperlicher Aktivität

Es ist bekannt, dass die Körpertemperatur in den Abendstunden absinkt, wenn der Melatoninspiegel steigt, und man müde wird. Körperliche Aktivität steht im Zusammenhang mit dem Stoffwechsel, und somit auch mit der Körperkerntemperatur. So wäre es möglich, dass die Körperkerntemperaturen von körperlich stärker aktiven Probanden anders verlaufen als die der Probanden mit geringerer körperlicher Aktivität. Dies wiederum könnte einen Einfluss auf die Schlafqualität der Probanden haben.

Die Tabellen 73, 74 und 75 stellen die Zusammenhänge zwischen der körperlichen Aktivität und der Körperkerntemperatur innerhalb der drei Probandengruppen dar. Es wurden sowohl die mittlere Gesamtaktivität der Probanden sowie die einzelnen Aspekte der Gesamtaktivität mit den mittleren Körperkerntemperaturen zu verschiedenen Zeitpunkten, dem mittleren Tagestemperatur-Wert und der Tages-Temperatur-Differenz korreliert. Hierbei gibt es nur einen statistisch signifikanten Zusammenhang bei jüngeren weiblichen Probanden. Hier zeigt sich ein negativer Zusammenhang zwischen der körperlichen Aktivität (Komponente Sport) und der Körperkerntemperatur um 12 Uhr mittags. Eine Tendenz zu diesem Zusammenhang gibt es auch um acht, 19 und 23 Uhr.

Tab. 73: Korrelationskoeffizienten zwischen der Körperkerntemperatur zu verschiedenen Uhrzeiten, der mittleren Körperkerntemperatur sowie der Tages-Temperatur-Differenz mit dem körperlichen Aktivitätsgrad bei 14 älteren Männern

Körperkerntemperatur (°C) zum Zeitpunkt	Körperlicher Aktivitätsgrad (METs)							
	Gesamtaktivität		Basisaktivitäten		Freizeitaktivitäten		Sport	
	r	p	r	p	r	p	r	p
T 8	-0,219	0,452	-0,37	0,193	0,113	0,701	0,14	0,634
T 12	-0,057	0,846	-0,265	0,361	0,254	0,382	0,129	0,659
T 16	0,052	0,861	-0,074	0,802	0,192	0,510	0,042	0,888
T 17	0,147	0,616	0,367	0,196	-0,21	0,472	-0,243	0,402
T 18	-0,03	0,920	-0,01	0,973	-0,001	0,998	-0,129	0,661
T 19	0,16	0,586	0,02	0,946	0,227	0,435	0,114	0,698
T 20	0,378	0,183	0,259	0,371	0,264	0,361	0,122	0,679
T 21	0,272	0,346	-0,028	0,923	0,475	0,086	0,213	0,466
T 22	0,159	0,588	-0,158	0,589	0,472	0,088	0,182	0,534
T 23	-0,013	0,964	-0,233	0,423	0,325	0,257	-0,001	0,998
T 24	0,066	0,822	-0,151	0,607	0,324	0,259	0,076	0,797
Mittlere Temperatur	0,161	0,583	0,019	0,949	0,255	0,378	0,032	0,914
Tages-Temperatur-Differenz	-0,087	0,768	-0,483	0,08	0,476	0,085	0,299	0,299

r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; p=Irrtumswahrscheinlichkeit

Tab. 74: Korrelation zwischen der Körperkerntemperatur zu verschiedenen Uhrzeiten, der mittleren Körperkerntemperatur sowie der Tages-Temperatur-Differenz mit dem körperlichen Aktivitätsgrad von 20 älteren Frauen

Körperkerntemperatur (°C) zum Zeitpunkt	Körperlicher Aktivitätsgrad (METs)							
	Gesamtaktivität		Basisaktivitäten		Freizeitaktivitäten		Sport	
	r	p	r	p	r	p	r	p
T 8	-0,156	0,512	-0,051	0,83	-0,383	0,095	0,296	0,204
T 12	0,235	0,318	0,026	0,913	0,205	0,386	0,203	0,392
T 16	-0,277	0,236	-0,34	0,143	-0,043	0,858	-0,098	0,682
T 17	-0,173	0,465	-0,085	0,721	-0,227	0,335	0,066	0,783
T 18	0,098	0,682	0,092	0,698	0,13	0,584	-0,102	0,670
T 19	0,146	0,540	-0,046	0,848	0,13	0,584	0,211	0,372
T 20	-0,129	0,587	-0,125	0,599	0,11	0,644	-0,293	0,210
T 21	0,249	0,290	0,327	0,159	0,197	0,405	-0,189	0,425
T 22	-0,043	0,856	0,037	0,876	-0,034	0,886	-0,102	0,669
T 23	-0,081	0,734	-0,015	0,950	-0,067	0,779	-0,065	0,787
T 24	0,001	0,996	0,01	0,967	0,094	0,693	-0,153	0,520
Mittlere Temperatur	0,009	0,970	0,044	0,852	0,054	0,820	-0,125	0,601
Tages-Temperatur-Differenz	0,118	0,621	0,062	0,794	0,231	0,328	-0,166	0,484

r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

Tab. 75: Korrelation zwischen der Körperkerntemperatur zu verschiedenen Uhrzeiten, der mittleren Körperkerntemperatur sowie der Tages-Temperatur-Differenz mit dem körperlichen Aktivitätsgrad von 10 jüngeren Frauen

Körperkerntemperatur (°C) zum Zeitpunkt	Körperlicher Aktivitätsgrad (METs)							
	Gesamtaktivität		Basisaktivitäten		Freizeitaktivitäten		Sport	
	r	p	r	p	r	p	r	p
T 8	0,123	0,735	0,19	0,598	0,424	0,222	-0,625	0,053
T 12	0,013	0,973	0,175	0,629	0,343	0,332	-0,722	0,018
T 16	0,223	0,536	0,325	0,359	0,397	0,256	-0,459	0,182
T 17	0,02	0,956	0,496	0,145	-0,027	0,942	-0,315	0,375
T 18	-0,01	0,978	0,53	0,115	-0,09	0,806	-0,3	0,399
T 19	-0,113	0,756	0,295	0,408	0,068	0,853	-0,621	0,055
T 20	0,223	0,536	0,325	0,359	0,397	0,256	-0,459	0,182
T 21	0,02	0,956	0,496	0,145	-0,027	0,942	-0,315	0,375
T 22	-0,01	0,978	0,53	0,115	-0,09	0,806	-0,3	0,399
T 23	-0,113	0,756	0,295	0,408	0,068	0,853	-0,621	0,055
T 24	0,126	0,729	0,557	0,094	0,11	0,762	-0,366	0,299
Mittlere Temperatur	0,075	0,836	0,433	0,211	-0,004	0,992	-0,177	0,625
Tages-Temperatur-Differenz	0,176	0,626	0,47	0,171	0,082	0,821	-0,129	0,723

r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

4.4.2 Zusammenhänge zwischen CAR und Tagesschläfrigkeit

Mit dem morgendlichen Anstieg der Cortisol-Konzentration reagiert der menschliche Körper auf das Erwachen. Ein großer Konzentrations-Anstieg wird durch einen niedrigen CAR-Wert wiedergegeben und deutet darauf hin, dass der Körper sich physiologisch auf das Wachsein einstellt. Der CAR-Wert errechnet sich aus den Werten des Cortisol-Morgenprofils, das über die ersten 60 Minuten nach dem Erwachen erstellt wird. Der CAR-Wert ist somit geeignet, um darauf zurückzuschließen, wie effizient sich der Körper auf die Wachphase einstellt. Es wäre möglich, dass die Umstellung von der Ruhephase auf die Wachphase bei Probanden mit erhöhter Tagesschläfrigkeit nicht so effektiv verläuft, wie bei Probanden ohne Tagesschläfrigkeit, und dies könnte ein Grund für die erhöhte Tagesschläfrigkeit sein.

Die Korrelationskoeffizienten zeigt Tabelle 76. Die Regressionsgeraden sind in Abbildung 75 dargestellt. Wie zu erkennen ist, findet sich in allen drei Gruppen ein positiver Zusammenhang. Das bedeutet, dass mit zunehmendem CAR-Wert eine erhöhte Tagesschläfrigkeit einhergeht bzw. dass eine erhöhte Tagesschläfrigkeit eher dann auftritt, wenn der morgendliche Cortisol-Anstieg gering ist. Dieser Befund ist bei keiner der Gruppen statistisch signifikant, liegt jedoch bei älteren Frauen nahe an der Signifikanzgrenze ($p = 0,052$).

Tab. 76: Korrelationskoeffizienten zwischen CAR und Tagesschläfrigkeit bei drei Probandengruppen

	N	Korrelation von CAR und ESS-Punkten	
		r	p
Ältere Männer	14	0,29	0,321
Ältere Frauen	20	0,44	0,052
Jüngere Frauen	10	0,31	0,377

r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

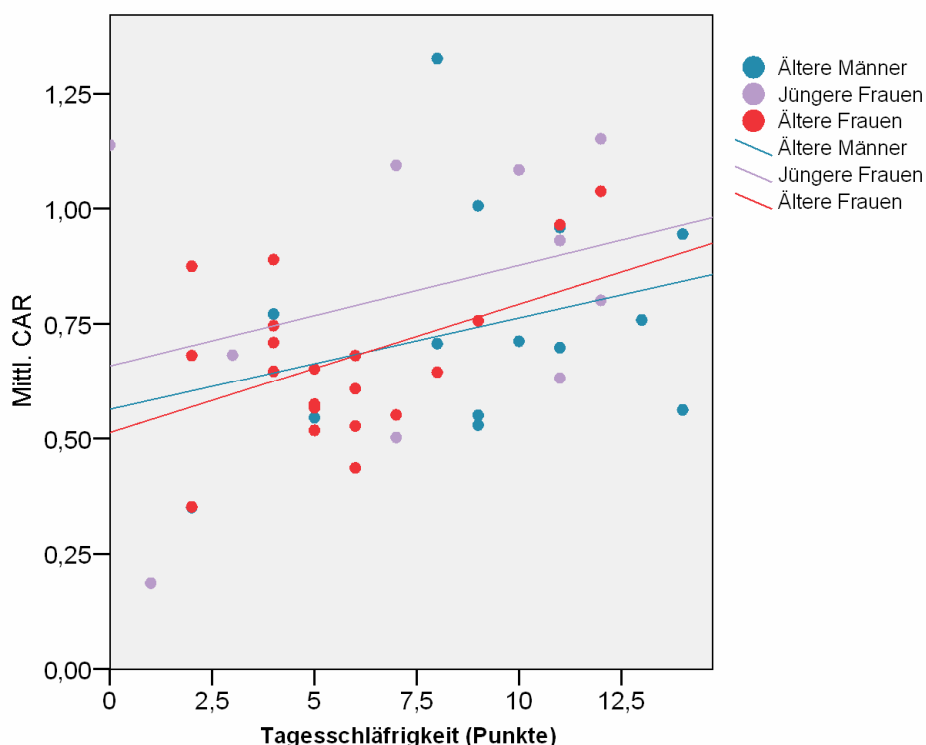


Abb. 75: Zusammenhang zwischen Tagesschläfrigkeit und CAR bei zehn jüngeren und 20 älteren Frauen, sowie 14 älteren Männern. Die Regressionsgeraden zeigen einen positiven Zusammenhang zwischen den beiden Variablen in allen drei Gruppen. Er ist jedoch in keiner der Gruppen statistisch signifikant.

Untersucht man diesen Zusammenhang separat für „gute Schläfer“ und „schlechte Schläfer“, so erhält man die in Tabelle 76 dargestellten Werte. Wie zu erkennen ist, tritt bei älteren Männern mit guter Schlafqualität ein hoher positiver und signifikanter Zusammenhang zwischen CAR und Tagesschläfrigkeit auf. Dies wird ebenfalls in Abbildung 76 deutlich. Das bedeutet, dass bei älteren Männern mit guter Schlafqualität die Neigung zu erhöhter Tagesschläfrigkeit umso höher ist, je geringer der morgendliche Anstieg der Cortisol-Konzentration ist. Innerhalb der anderen Gruppen bestehen keine statistisch signifikanten Zusammenhänge.

Tab. 76: Korrelation zwischen CAR und Tagesschläfrigkeit bei guten und schlechten Schläfern

	N	Korrelation von CAR und Tagesschläfrigkeit	
		r	p
Ältere Männer, gute Schläfer	9	0,78	0,012
Ältere Männer, schlechte Schläfer	5	0,28	0,653
Ältere Frauen, gute Schläfer	9	0,40	0,287
Ältere Frauen, schlechte Schläfer	11	0,46	0,159

r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

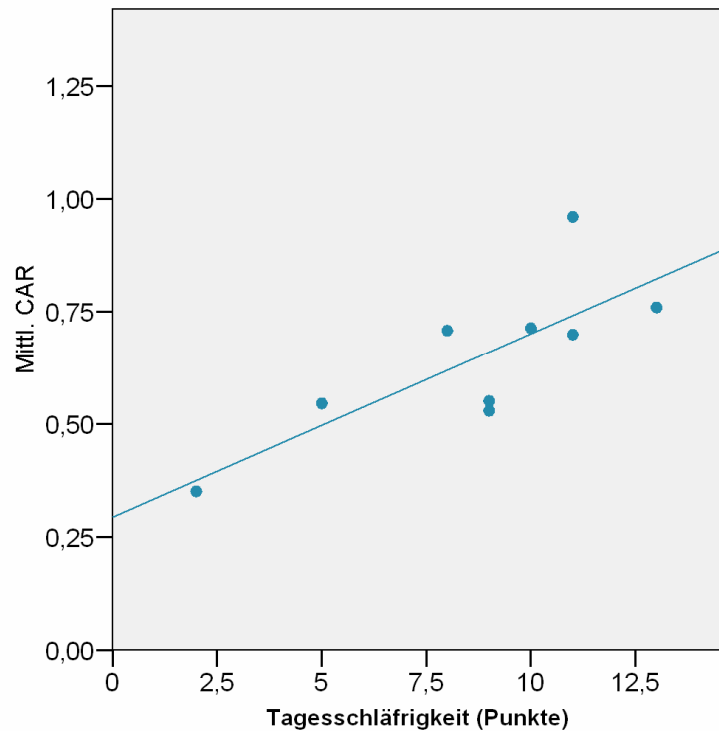


Abb. 76: Zusammenhang von Tagesschläfrigkeit und CAR bei neun älteren Männern mit guter Schlafqualität ($r = 0,78$; $p = 0,012$)

4.4.3 Zusammenhänge zwischen CAR und Körperkerntemperatur

Ein möglicher Zusammenhang zwischen der CAR und der Körpertemperatur um acht Uhr morgens wurde anschließend untersucht. Die CAR veranschaulicht, wie wach und potentiell physiologisch aktiv ein Proband innerhalb der ersten Stunde nach dem Erwachen ist. Die Körpertemperatur sinkt abends ab und bleibt während der Nachtstunden, in denen der Mensch schläft, niedrig. So könnte man vermuten, dass die Probanden, die besonders morgens um acht Uhr eine niedrige Körpertemperatur aufweisen, auch eine niedrige CAR zeigen. Dies würde bedeuten, dass es bei solchen Probanden morgens länger dauert, bis sie wach werden bzw. bis ihr Körper auf das Wachsein eingestellt ist, und der Stoffwechsel „hochgefahren“ wird. Wenn es solche Zusammenhänge gibt, wäre es außerdem interessant, in einem nachfolgenden Schritt zu untersuchen, ob dies hauptsächlich bei Abendtypen der Fall ist.

Die Korrelationskoeffizienten von CAR und Körpertemperatur zeigt Tabelle 78. Es zeigt sich ein signifikant positiver Zusammenhang bei älteren Frauen (Abb. 77). Das bedeutet für ältere Frauen, dass ein geringer Anstieg der Cortisol-Konzentration innerhalb der ersten 30 Minuten nach dem Erwachen mit einer erhöhten Körpertemperatur um acht Uhr morgens einhergeht.

Es gibt keine signifikanten Zusammenhänge bei den männlichen Probanden oder den jüngeren weiblichen Probandinnen.

Tab. 78: Korrelation zwischen CAR und Körperkerntemperatur um acht Uhr in drei Probandengruppen

	N	Korrelation von CAR und Körperkerntemperatur um acht Uhr	
		r	p
Ältere Männer	14	-0,06	0,842
Ältere Frauen	20	0,52	0,019
Jüngere Frauen	10	0,45	0,188

r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; p = Irrtumswahrscheinlichkeit; CAR = Cortisol Aufwach- Reaktion

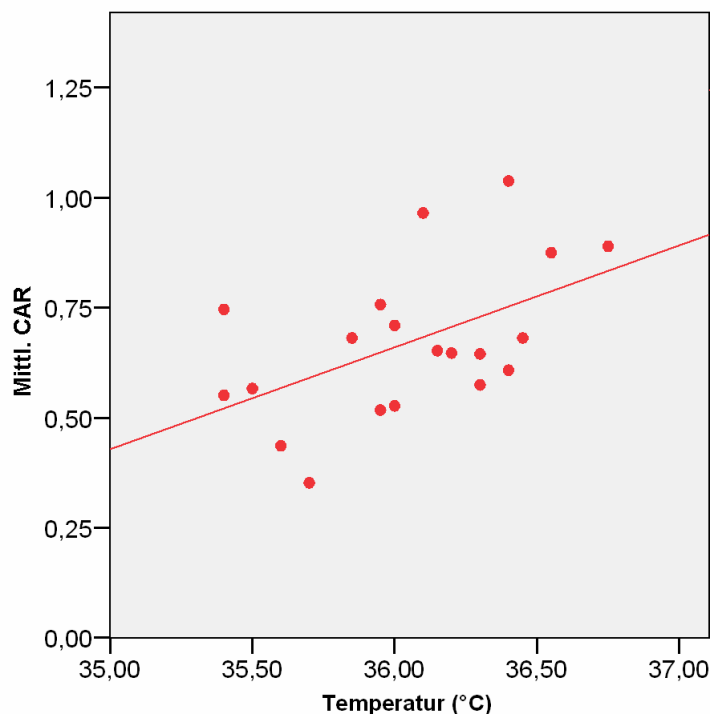


Abb. 77: Zusammenhang zwischen CAR und der Körperkerntemperatur um acht Uhr morgens bei 20 älteren Frauen (r = 0,52; p = 0,019)

4.4.4 Zusammenhänge zwischen Chronotyp und Schlafdauer

Als nächstes wurde der Zusammenhang zwischen dem Chronotyp und der Schlafdauer untersucht. Wie bereits beschrieben, werden Abendtypen zu einer späteren Uhrzeit müde als Morgentypen, und wachen auch später wieder auf, wenn sie ausschlafen können. Frühtypen hingegen werden früh müde, und wachen auch früh wieder auf. Durch das soziale Umfeld bedingt sind sowohl Aufsteh- als auch Zubettgeh-Zeitpunkt nicht immer dann möglich, wenn der Körper Müdigkeit oder Wachsein signalisiert. So könnte es sein, dass beispielsweise Spättypen weniger schlafen als Frühtypen, weil sie abends erst spät müde werden, und

dementsprechend spät schlafen gehen. Wenn sie dann gezwungen sind, früh aufzustehen, ist ihre Schlafdauer verkürzt. Andererseits könnte es auch sein, dass Frühtypen aus sozialen Gründen erst später ins Bett gehen, als ihr Müdigkeitsgefühl auftritt. Wenn sie dann trotzdem früh wach werden, wäre auch ihre Schlafdauer verkürzt. Die Zusammenhänge von Chronotyp und Schlafdauer erfolgte zunächst separat für die drei Probandengruppen (Tab. 79)

Tab. 79: Korrelationskoeffizienten zwischen Chronotyp und Schlafdauer bei drei Probandengruppen

	N	Zusammenhang von Chronotyp (Punkte) und Schlafdauer (min)	
		r	p
Ältere Männer	14	- 0,17	0,572
Ältere Frauen	20	- 0,54	0,014
Jüngere Frauen	10	0,05	0,883

r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

Es zeigt sich, dass in den beiden älteren Probandengruppen ein negativer Zusammenhang zwischen Chronotyp und Schlafdauer besteht. Einzig in der Gruppe der älteren Frauen lässt sich der Zusammenhang als statistisch signifikant absichern. Je höher somit die Punktzahl im D-MEQ, desto geringer die Schlafdauer. Da eine höhere Punktzahl von Morgentypen erreicht wird, kann man feststellen, dass weibliche ältere Morgentypen kürzer schlafen als Abendtypen. Abbildung 78 veranschaulicht dies graphisch.

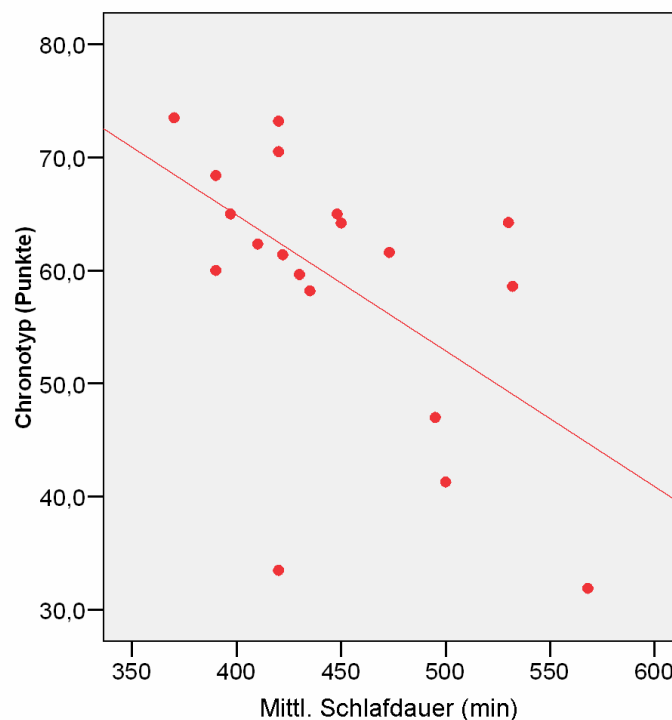


Abb. 78 Zusammenhang zwischen Chronotyp und Schlafdauer bei 20 älteren Probandinnen (r = 0,54; p = 0,014)

Anschließend wurden die Chronotypen separat nach ihrer Schlafqualität untersucht (Tab. 80). Wenn die Schlafdauer von Morgentypen und Abendtypen unterschiedlich ist, ist die Frage zu klären, ob dieser Zusammenhang sich auch in der Schlafqualität der Probanden wiederfindet. So wäre es möglich, dass jemand, der schlecht schläft, wieder aufsteht, obwohl das Schlafbedürfnis der Körpers noch nicht befriedigt ist, oder dass schlechte Schläfer länger Schlafen müssen, um den gleichen Erholungseffekt zu haben, wie gute Schläfer.

Tab. 80: Korrelationskoeffizienten von Chronotyp und Schlafdauer bei guten und schlechten Schläfern

	N	Zusammenhang von Chronotyp (Punkte) und Schlafdauer (min)	
		r	P
Ältere Männer, gute Schläfer	9	-0,25	0,521
Ältere Männer, schlechte Schläfer	5	-0,69	0,197
Ältere Frauen gute Schläfer	9	-0,84	0,004
Ältere Frauen, schlechte Schläfer	11	-0,32	0,338

R = Korrelationskoeffizient nach Pearson; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

Hier zeigt sich, dass der bereits beschriebene negative Zusammenhang zwischen Chronotyp und Schlafdauer besonders bei den älteren Probandinnen mit guter Schlafqualität ausgeprägt ist. Das bedeutet, dass ältere Frauen mit guter Schlafqualität umso weniger Schlafen, je stärker der Morgentyp bei ihnen ausgeprägt ist. Die Gruppe dieser Frauen zeigt einen statistisch sehr signifikanten Zusammenhang zwischen diesen Variablen. Abbildung 79 zeigt hierzu die Regressionsgerade.

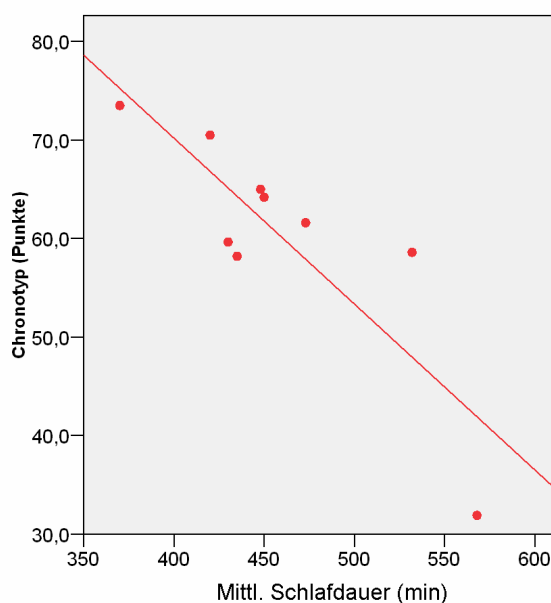


Abb. 79: Zusammenhang zwischen Chronotyp und Schlafdauer bei neun älteren Frauen mit guter Schlafqualität ($r = -0,84$; $p = 0,004$)

4.4.5 Zusammenhänge zwischen Schlafdauer und CAR

Als nächstes wurde der Zusammenhang zwischen der CAR und der Schlafdauer, unterteilt nach der Schlafqualität der Probanden, untersucht. Dies geschah, um zu untersuchen, ob die Schlafdauer einen Einfluss auf die CAR haben könnte. Das Cortisol ist ein Stresshormon. So wäre es möglich, dass der Aufwach-Prozess für einen Körper, der sich lange in der Schlafphase befunden hat, einen größeren Stressfaktor bedeutet, als für einen Körper, der weniger Zeit in diesem physiologische Ruhestadium verbracht hat.

Die Tabelle 81 enthält die Korrelationskoeffizienten der Variablen CAR und Schlafdauer. Abbildung 80 gibt die Werte mit Regressionsgerade graphisch wieder.

Tab. 81: Zusammenhang zwischen CAR und Schlafdauer bei guten bzw. schlechten Schläfern

	N	Zusammenhang von CAR und Schlafdauer (min)	
		r	p
Ältere Männer, gute Schläfer	9	0,81	0,008
Ältere Männer, schlechte Schläfer	5	-0,12	0,849
Ältere Frauen gute Schläfer	9	-0,36	0,348
Ältere Frauen, schlechte Schläfer	11	0,25	0,456

r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

In der Gruppe der älteren Männer mit guter Schlafqualität zeigt sich ein hoher positiver Zusammenhang zwischen der CAR und der Schlafdauer, der statistisch sehr signifikant ist. Man kann also sagen, dass für die Gruppe der älteren Männer mit guter Schlafqualität gilt: Je länger die Schlafdauer der Probanden war, desto stärker war der morgendliche Cortisol-Anstieg.

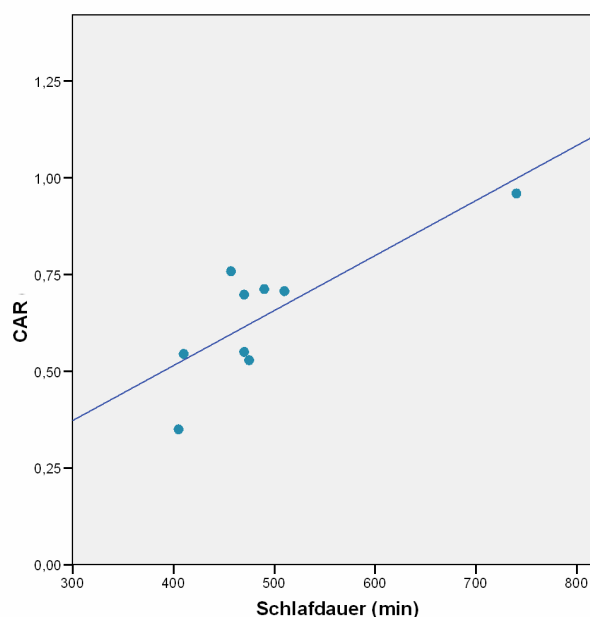


Abb. 80: Zusammenhang zwischen CAR und Schlafdauer bei älteren Männern mit guter Schlafqualität (r = 0,81; p = 0,008)

4.4.6 Zusammenhänge zwischen Chronotyp und CAR

Es wurde geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen dem Chronotyp und der CAR besteht, weil geklärt werden sollte, ob es Hinweise darauf gibt, dass der Aufwachvorgang für verschiedene Chronotypen einen unterschiedlichen Stressfaktor bedeutet. So wäre es möglich, dass bei Morgentypen, die morgens schneller wach werden als Abendtypen, mehr Cortisol ausgeschüttet wird als bei Abendmenschen. Es wäre aber auch möglich, dass bei Morgenmenschen weniger Cortisol ausgeschüttet wird, weil der Aufwachvorgang für ihren Körper weniger Stress bedeutet als für den der Abendtypen.

Tabelle 82 enthält die Korrelationskoeffizienten der Variablen Chronotyp und CAR.

Tab. 82: Zusammenhang von Chronotyp und CAR in drei Probandengruppen

	N	Zusammenhang von Chronotyp und CAR	
		r	p
Ältere Männer	14	-0,33	0,255
Ältere Frauen	20	-0,10	0,683
Jüngere Frauen	10	0,65	0,044

r = Korrelationskoeffizient nach Pearson; p = Irrtumswahrscheinlichkeit

Bei beiden älteren Probandengruppen besteht ein negativer, statistisch jedoch nicht signifikanter, Zusammenhang zwischen Chronotyp und CAR-Werten. Anders bei den jüngeren Frauen. Hier ist ein positiver, statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden Variablen vorhanden. Veranschaulicht wird dies in der Abbildung 81.

Das bedeutet, je stärker die Tendenz der jüngeren Frauen zum Morgentyp ist, desto geringer ist der Cortisol-Anstieg während der ersten 30 Minuten nach dem Erwachen.

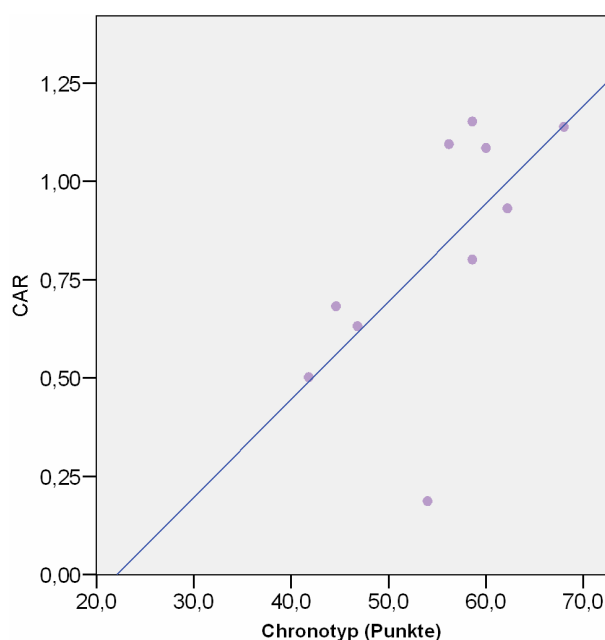


Abb. 81: Zusammenhang von Chronotyp und CAR bei zehn jüngeren Frauen ($r = 0,65$; $p = 0,044$)

5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Erkenntnisse über die Zusammenhänge zwischen den chronobiologischen Markersystemen Körperkerntemperatur, Uhrengene (*hBMAL1*, *hPER1*) und Hormone (Cortisol, Melatonin) sowie Veränderungen von Schlafqualität, Tagesschläfrigkeit, Chronotyp, und Saisonalität im Rahmen von Alternsprozessen beim Menschen zu erlangen. Hierzu wurde ein Probandenkollektiv von 44 Probanden untersucht. Die Ergebnisse aus sechs verschiedenen Fragebögen, Hormonuntersuchungen (ELISAs) und Gen-Expressionsprofilen wurden miteinander verglichen und in Zusammenhang gebracht.

Im nachfolgenden Teil sollen die Ergebnisse diskutiert und mit internationaler Literatur verglichen werden.

5.1 Beeinflussung der Schlafqualität durch exogene Faktoren und Zusammenhänge mit anderen circadianen Markersystemen

Sieht man sich die Verteilung von guten zu schlechten Schläfern in den Probandengruppen an, so zeigt sich, dass der Anteil an schlechten Schläfern in der Gruppe der älteren Frauen am höchsten ist. In dieser Gruppe weisen etwa 50% der Probandinnen eine schlechte Schlafqualität auf. Bei den älteren Männern ist dies bei etwa 1/3 der Fall.

In den beiden älteren Probandengruppen wurde bei der Auswahl der Probanden für die Studie nicht danach unterschieden, ob sie unter Schlafstörungen litten, oder nicht. Bezöge man die Verteilung von guten Schläfern zu schlechten Schläfern in dieser Studie auf die selbständig lebende deutsche Gesamtbevölkerung, so würde dies bedeuten, dass etwa die Hälfte aller Frauen über 60 Jahren, aber nur etwa ein Drittel der männlichen Bevölkerung in der gleichen Altersgruppe unter Schlafstörungen leiden. Bei den jüngeren weiblichen Probandinnen wurden nur solche mit einer guten Schlafqualität in diese Studie einbezogen. Tatsächlich musste im Vorfeld auch nur eine einzige jüngere Probandin wegen schlechter Schlafqualität von der Studie ausgeschlossen werden. Grundsätzlich kann man also davon ausgehen, dass die Schlafqualität in der weiblichen deutschen Bevölkerung bis 30 Jahren gut ist. Nach Kenntnis der Autorin gibt es bisher keine Studie, die dies speziell für die deutsche Bevölkerung belegen würde.

Die Altersverteilung der Probanden zeigt, dass die älteren Männer und Frauen mit $68,29 \pm 2,95$ Jahren (Männer) bzw. $67,90 \pm 5,12$ Jahren (Frauen) ein ähnliches mittleres Alter haben. Dies ist eine gute Voraussetzung, um diese beiden Gruppen auf Geschlechtsunterschiede in chronobiologischen Merkmalen zu vergleichen. Der Unterschied zwischen den jüngeren Frauen ($25,70 \pm 1,83$ Jahre) und älteren Frauen beträgt im Mittel mehr als 42 Jahre, weshalb auch die Voraussetzung für Vergleiche unter dem Gesichtspunkt des Alters gegeben sind.

Die Ergebnisse der Fragebögen zeigen weitere Unterschiede zwischen den drei Probandengruppen auf, die für die unterschiedlichen Schlafqualitäten (mit-)verantwortlich sein könnten.

Wie bereits aus der Literatur bekannt ist, verschiebt sich der Chronotyp des Menschen im Laufe seines Erwachsenen-Lebens immer weiter in Richtung Morgentyp (Carrie et al. 1997, Robillard et al. 2002). Diese Aussage wurde im Rahmen dieser Studie nach der Auswertung des D-MEQs bestätigt. So finden sich in der Gruppe der jüngeren Frauen 3/10 Frühtypen. Diese sind somit deutlich in der Unterzahl und es kommen keine Extremtypen vor. Bei den älteren Frauen sind 14 der 20 Probandinnen, also 70%, als Frühtypen einzustufen, und drei (21,4%) sogar als extreme Frühtypen. Hier liegt also ein deutlicher altersbedingter Unterschied vor. In der Gruppe der älteren Männer liegt der Anteil der Frühtypen mit zwölf von 14 Personen (85,7%) sogar noch höher. Hier können zwei extreme Frühtypen ausgemacht werden. Auf das Kriterium „Geschlecht“ bezogen bedeutet dies, dass die Frühtypen in der Gruppe der älteren Männer noch häufiger vertreten sind als in der Gruppe der älteren Frauen.

Allgemeiner Forschungsstand ist, dass körperliche Aktivität und der Aufenthalt im Sonnenlicht bzw. die Einwirkung von kurzweiligem Licht, einen positiven Einfluss auf die Schlafqualität haben (Ancoli-Israel et al. 2002, Morita und Tokura 1996, O'Connor und Youngstedt 1995, Ohayon et al. 2001, Sherill et al. 1998).

Diese Feststellungen konnten in dieser Studie nicht, oder nur bedingt bestätigt werden. So unterscheidet sich die körperliche Gesamtaktivität zwischen den älteren Männern und Frauen nicht voneinander. Wider Erwarten war die Gesamt-Aktivität der älteren Probanden mit schlechter Schlafqualität höher als die der guten Schläfer. Dies gilt für beide Geschlechter. Weiterhin ist die körperliche Aktivität in der Gruppe der jüngeren Probandinnen, die durchgehend eine positive Schlafqualität aufwiesen, im Mittel niedriger als in den älteren Probandengruppen. Eine schlechte Schlafqualität aufgrund von Bewegungsmangel lässt sich hier also nicht nachvollziehen.

Ein Grund dafür, dass die Gesamtaktivität innerhalb der jüngeren Studienteilnehmerinnen so gering ist, könnte sein, dass diese Gruppe fast ausschließlich aus Diplomandinnen und Doktorandinnen bestand, die zum Zeitpunkt der Studie sehr stark in ihre Arbeit eingebunden waren und deshalb mehr Zeit am Schreibtisch, im Labor o.ä. verbrachten, als mit körperlicher Aktivität. Weitere Gründe für dieses unerwartete Ergebnis könnten sein, dass der Einfluss von körperlicher Aktivität auf die Schlafqualität überschätzt wird. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, weil in mehreren Studien der positive Einfluss von körperlicher Aktivität auf das Allgemeinbefinden und die Schlafqualität belegt werden konnte (Sherill et al. 1998, O'Connor und Youngstedt 1995, Irwin et al. 2008). Die zweite Erklärungsmöglichkeit besteht darin, dass hier die statistische Power aufgrund der kleinen Stichprobengröße nicht

ausreicht. Die dritte Möglichkeit ist, dass nicht nur der Gesamtaktivitätsumfang eine Rolle bei der Beeinflussung der Schlafqualität spielt, sondern dass es auch von Bedeutung ist, wie diese Aktivität zustande kommt.

Bei den Probanden wurde erfragt, wie viel Zeit sie durchschnittlich pro Tag im Freien verbringen. Dies ist in der Annahme begründet, dass die Zeitdauer, die die Menschen im Freien, also bei Tageslicht, verbringen, ihre Schlafqualität positiv beeinflussen kann, da das Tageslicht als bedeutenster exogener Zeitgeber dazu führt, dass der menschliche Körper zwischen Tag und Nacht unterscheiden kann, und sich somit zum richtigen Zeitpunkt physiologisch auf Schlaf einstellen kann (Fleissner 1996, Gander et al. 1991, Münch et al. 2005). Die Ergebnisse zeigen zunächst, dass es Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen älteren Probanden gibt. Die Männer verbringen wesentlich mehr Zeit im Freien als die Frauen. Diese Unterschiede sind jedoch statistisch nicht signifikant. Allerdings zeigte ein Vergleich der Zeitdauer, die im Freien verbracht wurde zwischen älteren guten Schläfern und schlechten Schläfern keine statistisch signifikanten Unterschiede. Der Vergleich von jüngeren und älteren Frauen zeigt, dass die älteren Frauen, die ja anteilig aus mehr schlechten Schläferinnen als guten Schläferinnen bestehen, mehr Zeit im Freien verbringen, als die jüngeren Frauen. Diese Tatsache könnte darauf hindeuten, dass das circadiane System des Menschen in jüngeren Jahren sensibler auf Lichtreize reagiert, also effektiver auf Zeitgeber-Reize reagiert, während im Alter stärkere Reize nötig sind, um das System anzupassen.

Auch der Zusammenhang von „alleine Schlafen“ oder „mit anderer Person im Raum oder Bett schlafen“ spielt laut Literatur eine Rolle im Zusammenhang mit der Schlafqualität. Diese Annahme beruht darauf, dass man davon ausgeht, dass die Bewegungen und Geräusche einer anderen Person im Raum den eigenen Schlaf stören können (Strawbridge et al. 2004). Wie die vorliegende Arbeit zeigt, lebte die Mehrheit der älteren männlichen und jüngeren weiblichen Probanden nicht allein und schlief dementsprechend auch nicht allein. Trotzdem ist die Schlafqualität in diesen beiden Gruppen besser als in der Gruppe der älteren weiblichen Frauen, in der etwa zwei Drittel alleine lebten und dementsprechend auch alleine schliefen. Dieser Faktor kann also eine Rolle bei der Beeinflussung des Schlafes spielen, scheint in dem vorliegenden Probandenkollektiv jedoch keine entscheidende Bedeutung zu haben. In Hasler und Troxel weisen außerdem darauf hin, dass die Schlafqualität nicht nur davon abhängt, ob eine weitere Person mit im Raum oder Bett schläft, sondern dass auch das Verhältnis von diesen Personen zueinander ein wichtiger Einflussfaktor für die Schlafqualität ist (Troxel 2007). Sie konnten zeigen, dass Ehepaare, die ein gutes Verhältnis zueinander hatten, gut schliefen, während eine schlechte Schlafqualität besonders bei Männern dazu führte, dass sie die partnerschaftlichen Interaktionen am darauffolgenden Tag negativer bewerteten (Hasler und Troxel 2010). Weitere Einflussfaktoren, die theoretisch

einen Einfluss auf die Schlafqualität haben könnten, wurden in der Ernährung, speziell dem Konsum von Kaffee, Tee und Alkohol vermutet (Brezinová 1976, Grandner et al. 2010).

Auch die Einnahme von Medikamenten und der damit zusammenhängende Gesundheitszustand wurden als Faktoren in Betracht gezogen, die Einfluss auf die Schlafqualität der Probanden haben könnten. Im Falle des Alkoholkonsums konnte zwar festgestellt werden, dass die älteren Männer im Mittel fast doppelt soviel Alkohol zu sich nehmen wie die jüngeren Frauen, aber diese Unterschiede sind statistisch nicht signifikant. Unterteilt man die beiden älteren Probandengruppen jedoch nach ihrer Schlafqualität, so ergeben sich signifikante Unterschiede. Die älteren Frauen mit schlechter Schlafqualität tranken signifikant mehr Alkohol ($4,5 \pm 3,3$ Gläser/Woche) als die Frauen mit guter Schlafqualität ($1,56 \pm 1,26$ Gläser/Woche). Hier stellt sich die Frage, ob der Genuss von Alkohol zu einer schlechteren Schlafqualität führt, oder ob die Frauen Alkohol trinken, damit sie besser einschlafen können. Aus der Literatur ist der negative Einfluss von Alkoholgenuss auf den Schlaf bekannt. In mehreren kürzlich erschienenen Veröffentlichungen (Brager et al. 2010, Thakkar et al. 2010) wurde der Einfluss von Alkohol auf die Schlafqualität im Tierversuch an Ratten und Mäusen getestet. Hierbei zeigt sich, dass sowohl der Konsum einer großen Menge Alkohols, wie auch der dauerhafte Genuss von Alkohol zu typischen Anzeichen von Schlaflosigkeit und Veränderungen der circadianen Rhythmik führen. Die Ratten waren grundsätzlich leichter in ihrem Schlaf zu stören, wiesen verlängerte Wachphasen auf und hatten kürzere NREM-Phasen. In der Studie von Brager et al. (2010) wurden zusätzlich direkte Einflüsse von dauerhaftem Alkohol-Genuss auf die SCN nachgewiesen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass in der Gruppe der älteren Frauen mit schlechter Schlafqualität tatsächlich ein negativer Einfluss des Alkohols auf die Schlafqualität vorliegt. Allerdings ist diese Aussage kritisch zu betrachten, da der Konsum von etwa 4,5 Gläsern Alkohol pro Woche wesentlich niedriger ist als die Menge Alkohols, die in den genannten Studien eingesetzt wurde.

Auch bei der Betrachtung des Genusses von koffeinhaltigem Kaffee und Schwarztee bzw. grünem Tee konnten Unterschiede zwischen den verschiedenen Probandengruppen festgestellt werden. Hier konnte gezeigt werden, dass in beiden älteren Probandengruppen signifikant mehr von diesen Nahrungsmitteln konsumiert wird, als in der Gruppe der jüngeren Frauen. Auch dies könnte in Zusammenhang mit der Schlafqualität stehen, da die aufputschende Wirkung des Koffeins bzw. Teins zu Schlafstörungen führen könnte. Allerdings konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede im Kaffee- bzw. Tee-Konsum zwischen den Gruppen der guten Schläfer und schlechten Schläfer ausgemacht werden, und somit ist auch diese Vermutung mit Vorsicht zu betrachten.

Auch die Tagesschläfrigkeit ist ein Faktor, der im Rahmen dieser Studie untersucht wurde, und der mit der Schlafqualität der Probanden in Zusammenhang stehen könnte. So ist eine

Vermutung, dass die Probanden mit Schlafstörungen am Tag ihr Schlafdefizit aus der Nacht aufholen müssen. Die andere Vermutung ist, dass die Probanden abends nicht einschlafen können, wenn sie den Tag über schon viel geschlafen haben. Hier ergab die vorliegende Studie, dass die meisten älteren Frauen (18/20) keine Tagesschläfrigkeit zeigten, obwohl etwa die Hälfte (11/20) unter Schlafstörungen litten. Das bedeutet, dass eine schlechte Schlafqualität nicht zu Tagesschläfrigkeit führen muss. In der Literatur wurde jedoch bereits mehrfach ein Zusammenhang zwischen schlechter Schlafqualität und erhöhter Tagesschläfrigkeit hergestellt (Janson et al. 1990, Malakouti et al. 2009, Zailinawati et al. 2009).

Korrelationsanalysen ergaben in der Gruppe der älteren Frauen einen signifikanten negativen Zusammenhang zwischen Chronotyp und Schlafdauer. Unterteilt man die Probanden zusätzlich in gute Schläfer und schlechte Schläfer, wird deutlich, dass es speziell bei den älteren Frauen mit der guten Schlafqualität einen sehr signifikanten Zusammenhang zwischen den beiden genannten Variablen gibt. Das bedeutet, je mehr die Frauen Richtung Frühtyp tendieren, desto weniger schlafen sie. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch von Roenneberg et al. gefunden. Die Arbeitsgruppe konnte in einer Studie zeigen, dass Morgentypen an freien Tagen wenig schlafen, während Spättypen in der Woche weniger schlafen als an freien Tagen, wie dem Wochenende (Roenneberg et al. 2007). Das deutet darauf hin, dass Spättypen in der Lage sind, ein Schlafdefizit, das sich während der Arbeitstage bei ihnen ansammelt, am Wochenende durch längeres Schlafen auszugleichen. Frühtypen hingegen werden in der Woche schon früher müde, gehen früh ins Bett und sind somit ausgeschlafen, wenn sie morgens aufstehen. Sie benötigen somit an freien Tagen, also beispielsweise dem Wochenende, keine längere Schlafphase.

5.2 Unterschiede in der Rhythmik von Körperkerntemperatur und der Synthese-Rate der Hormone Cortisol und Melatonin

Betrachtet man die Ergebnisse, die im Zusammenhang mit der Körperkerntemperatur der Probanden vorgestellt wurden, so fallen mehrere Punkte auf. Die Körperkerntemperatur der jungen Frauen liegt zu jedem Zeitpunkt des Tages über derjenigen der älteren Probanden. Einzige Ausnahme hiervon ist der 17 Uhr-Wert. Sieht man sich den Verlauf der Körperkerntemperatur der jüngeren weiblichen Probandinnen an, so zeigt sich, dass die Körperkerntemperatur in dieser Gruppe zu keinem Zeitpunkt niedriger ist als 36°C. Dies ist bei älteren Männern und Frauen anders. Bei diesen ist die Körperkerntemperatur niedriger. Der Vergleich der mittleren Körperkerntemperaturen von jüngeren und älteren Frauen ergab signifikante Unterschiede in den Abendstunden zwischen 20 und 24 Uhr. Die Differenz zwischen niedrigstem und höchstem Temperatur-Wert ist bei den jüngeren Frauen mit 0,42 °C wesentlich geringer als bei den anderen älteren Probanden mit 0,61°C (ältere Männer)

bzw. $0,70^{\circ}\text{C}$ (ältere Frauen). Das bedeutet, dass jüngere weibliche Probandinnen über den Tag hinweg, aber besonders in den Abendstunden, konstanter und mehr Wärme produzieren, als ältere Probanden beiderlei Geschlechts. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Stoffwechselaktivität der jüngeren Probandinnen höher ist, als die der älteren Probanden. Obwohl die Verläufe der Körperkerntemperatur von älteren Männern und Frauen recht ähnlich ist, gibt es einen signifikanten Temperatur-Unterschied um 17 Uhr und anschließend eine deutliche Annäherung der Kurven aneinander. Hierzu ist zu bemerken, dass fast alle Probanden im Zeitraum zwischen 18 und 19 Uhr ein leichtes Abendessen zu sich nahmen. Am kurzzeitigen Anstieg der Temperaturkurve könnte somit die „nahrungsinduzierte Thermogenese“ (Silverthorn 2009) d.h. der Anstieg der Körperkerntemperatur nach Nahrungsaufnahme, erkennbar sein. Auch ein Zusammenhang der Körperkerntemperatur mit der Schlafqualität konnte gezeigt werden. Die Körperkerntemperatur-Kurven der guten Schläfer verlaufen tagsüber grundsätzlich höher als die der schlechten Schläfer. Hieraus kann man schließen, dass die Höhe der Stoffwechselaktivität in Zusammenhang mit der Schlafqualität steht. Die Körperkerntemperatur-Unterschiede zwischen Probanden mit guter bzw. schlechter Schlafqualität sind bei den Männern um 16 Uhr signifikant, bei den Frauen um zwölf und 16 Uhr. In einer kürzlich erschienenen Studie zeigten Markwald et al., dass die Gabe des Melatonin- Agonisten „Ramelteon“ bei Probanden zum Absinken der Körpertemperatur führte und in einer verbesserten Schlafqualität resultierte (Markwald et al. 2010). Dies lässt sich zusammenfassend so deuten, dass für eine gute Schlafqualität hohe Körperkerntemperaturen am Tage und niedrige Körperkerntemperaturen in der Nacht bzw. ein deutlicher Unterschied zwischen den Körperkerntemperaturen während dieser beiden Zeiträume zuträglich sind.

Außerdem fällt auf, dass die Körperkerntemperatur-Kurven der jüngeren Frauen sowie der älteren Männer und Frauen sich morgens und über den Tag hinweg relativ stark voneinander unterscheiden. In den Abendstunden nähern sich die mittleren Temperatur-Werte der älteren Probandengruppen einander deutlich an, wohingegen die Differenz zu den Werten der jüngeren Probandinnen immer größer wird. Zwischen den Temperatur-Werten älterer und jüngerer Frauen von 20, 22, 23 und 24 Uhr treten signifikante Unterschiede auf, wobei die höheren Werte bei den jüngeren Frauen zu finden sind. Diese Unterschiede sind über den Tag hinweg nicht signifikant. Grundsätzlich muss aber innerhalb der Nachtstunden und frühen Morgenstunden, die nicht in den Messbereich dieser Studie fielen, wiederum eine starke Divergenz zwischen den Körperkerntemperatur-Verläufen bzw. der Stoffwechselaktivität von jüngeren und älteren Probanden auftreten, die zu dem großen Temperatur-Unterschied um acht Uhr morgens führt. Gerade dieser Zeitraum ist derjenige, in dem die Probanden schlafen und somit die Schlafstörungen, also Einschlaf- und Durchschlafstörungen, auftreten. Besonderheiten im Temperaturverlauf von guten und

schlechten Schläfern während der Nacht konnten hier also aufgrund des Messzeitraumes nicht untersucht werden. Trotzdem gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen veränderten Körperkerntemperatur-Verläufen in den Nacht- und frühen Morgenstunden, die zumindest anteilig mit dem Auftreten von Schlafstörungen in Verbindung stehen könnten.

Auch Nakazawa et al. konnten Unterschiede im Verlauf der Körperkerntemperatur von jüngeren und älteren Probanden feststellen. Sie zeigten, dass in ihrer Studienpopulation die 24-Stunden-Rhythmik der älteren Probanden gegenüber der der jüngeren Probanden vorverlagert war und stellten eine signifikante negative Korrelation von Alter und Zeitpunkt der höchsten Körpertemperatur fest (Nakazawa et al. 1991). Das heißt, je älter die Probanden waren, desto eher erreichten sie den täglichen Höhepunkt ihrer Körperkerntemperatur.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die jüngeren weiblichen Probandinnen eine wesentlich geringere körperliche Aktivität an den Tag legen als ihre älteren Geschlechtsgenossinnen oder ältere Männer. Die einzigen statistisch signifikanten Zusammenhänge, die zwischen der Körperkerntemperatur und der körperlichen Aktivität hergestellt werden konnten, finden sich bei jungen Frauen. So gibt es einen negativen Zusammenhang zwischen der Gesamtaktivität und der Körpertemperatur ($r = -0,722$; $p=0,018$). Um acht Uhr und um 19 Uhr liegen die Werte an der Signifikanzgrenze (8 Uhr: $r = -0,625$; $p = 0,053$; 19 Uhr: $r = -0,621$; $p = 0,055$). In den beiden älteren Probandengruppen bestand kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Körperkerntemperatur und körperlicher Aktivität. Innerhalb der jüngeren Probandinnen besteht weiterhin ein statistisch signifikanter negativer Zusammenhang zwischen der Körperkerntemperatur um zwölf Uhr mittags und der körperlichen Aktivität, die durch Sport zustande kommt. Außerdem gibt es die Tendenz zu einem negativen Zusammenhang zwischen der sportlichen Aktivität und der Körperkerntemperatur um acht, 19 und 23 Uhr. Das bedeutet somit: je mehr Sport die Probandinnen treiben, desto niedriger ist ihre Körperkerntemperatur um zwölf Uhr Mittags und wahrscheinlich auch um acht, 19 und 23 Uhr.

Ein weiterer statistisch signifikanter Zusammenhang bestand zwischen der Körperkerntemperatur um acht Uhr morgens und dem CAR-Wert bei den älteren Frauen. Das bedeutet, je höher die Körperkerntemperatur der älteren Frauen morgens um acht Uhr ist, desto höher ist ihre Cortisolausschüttung direkt nach dem Erwachen im Vergleich zur Cortisol-Ausschüttung 30 Minuten nach dem Erwachen. Oder anders ausgedrückt: Je höher die Körperkerntemperatur um acht Uhr morgens war, desto geringer war der Cortisol-Anstieg der Frauen innerhalb der ersten 30 Minuten nach dem Erwachen. Dies könnte wie folgt begründet sein: eine niedrige Körpertemperatur ist mit der Schlafphase verbunden, eine hohe Körpertemperatur mit der Wachphase. Der Aufwachvorgang erfordert einen hohen Anstieg der Cortisol-Konzentration im Körper, weil er einen Stressfaktor für den Körper

darstellt. Ist die Körpertemperatur bereits relativ hoch, deutet dies darauf hin, dass der Körper bereits auf die Wachphase eingestellt ist, und weniger Cortisol-Ausschüttung ist notwendig. Zu dieser These gibt es nach Kenntnis der Autorin bisher keine Vergleichsliteratur.

Die Analyse der mittleren Cortisol-Aufwachkonzentrationen und des morgendlichen Cortisol-Profiles ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen jüngeren Frauen, älteren Frauen und älteren Männern. Erwähnenswert ist dennoch der Cortisol-Wert, der 45 Minuten nach dem Erwachen auftritt. Er zeigt bei jüngeren Frauen im Vergleich zu älteren Frauen einen Anstieg um fast 50% gegenüber dem 30-Minuten-Wert. Dies ist jedoch statistisch nicht signifikant. Die Höhe des Anstiegs und auch der Zeitpunkt fallen unter die Cortisol-Aufwachkonzentration, die mit einem Cortisol-Anstieg innerhalb der ersten 30 bis 60 Minuten um 50 bis 100% definiert ist. Während es zwischen den Geschlechtern und den Altersgruppen kaum signifikante Zusammenhänge bzw. Unterschiede gibt, gibt es Hinweise darauf, dass die morgendlichen Cortisol-Konzentrationen der Probanden in Zusammenhang mit deren Schlafqualität stehen. So zeigen die Speichel-Cortisol-Konzentrationen von Männern mit guter Schlafqualität 30, 45 und 60 Minuten nach dem Erwachen signifikant höhere Werte als die der älteren Männer mit schlechter Schlafqualität. Der Grund hierfür könnte folgender sein: Cortisol ist ein Stress-Hormon. Seine vermehrte Ausschüttung innerhalb der ersten 30 Minuten nach dem Erwachen könnte so gedeutet werden, dass das Erwachen eine anstrengende physiologische Leistung für den Körper darstellt, die Stress für ihn bedeutet. Schlechte Schläfer erreichen oft nicht die tieferen Schlafphasen und haben somit einen leichteren Schlaf als gute Schläfer. Ihnen könnte das Erwachen deshalb „physiologisch leichter fallen“ als den guten Schläfern, und dies könnte zu einer geringeren Cortisol-Ausschüttung führen. Auch der CAR-Wert unterscheidet sich zwischen diesen beiden Gruppen signifikant, was auf der Formel zur Berechnung des CAR-Werts beruhen dürfte, die den 30-Minuten-Wert mit einbezieht. Je kleiner der 30-Minuten-Wert ist, desto höher ist der CAR-Wert.

Der CAR-Wert steht bei den älteren Männern mit guter Schlafqualität in einem signifikanten positiven Zusammenhang mit der Tagesschläfrigkeit. Das bedeutet, je höher der morgendliche CAR-Wert, bzw. je geringer der Anstieg der Cortisol-Konzentration während der ersten 30 Minuten nach dem Erwachen ist, desto höher ist die Tagesschläfrigkeit bei diesen Probanden ausgeprägt. Ein solcher Zusammenhang wäre nach der vorhergehenden Argumentation wahrscheinlich eher bei den guten Schläfern zu gewesen. Sieht man sich jedoch die mittleren Cortisol-Aufwachkonzentrationen von Probanden mit guter Schlafqualität und denen mit schlechter Schlafqualität an, so fällt auf, dass die männlichen guten Schläfer eine höhere Ausgangskonzentration aufweisen als die Männer mit schlechter Schlafqualität. Da auch dieser Wert mit in die Berechnung des CAR-Werts einfließt, bedeutet dies, dass ein

männlicher Proband mit einem hohen CAR-Wert, also einem geringen Cortisol-Anstieg während der ersten 30 Minuten nach dem Erwachen, dennoch eine höhere Cortisol-Konzentration aufweisen kann als ein Proband mit schlechter Schlafqualität und einem hohen CAR-Wert. Und dieser Wert kann dann durchaus mit einer erhöhten Tagesschläfrigkeit korrelieren. Dies gilt jedoch nicht für die Gruppe der älteren Frauen. Hier wird die Signifikanz im Zusammenhang von CAR und Tagesschläfrigkeit nur knapp verfehlt, aber in dieser Gruppe wird die höhere Cortisol-Aufwach-Konzentration von den schlechten Schläferinnen erreicht. Hier scheint es also einen Unterschied in der Bedeutung der CAR zwischen den Geschlechtern zu geben. Dies könnte auf zwei verschiedene Zusammenhänge hindeuten. So könnte es sein, dass der Körper schlechter Schläferinnen zum Aufwach-Zeitpunkt bereits auf die Aufwachphase vorbereitet ist, weil er bereits während der Nacht mehrfach einen Aufwach-Vorgang durchgeführt hat, und der Aufwach-Vorgang, der zum Aufstehen des Probanden führt im Sinne eines Trainingseffektes keinen großen Stressfaktor für den Körper darstellt. Es wäre aber auch denkbar, dass die schlechte Schlafqualität zu einer verminderten Erholungsphase geführt hat, und der Körper der schlechten Schläferinnen deshalb physiologisch nicht in der Lage ist, eine ausgeprägte Cortisol-Aufwachreaktion herbeizuführen. Vergleichsliteratur hierzu liegt nicht vor.

Ebenfalls in der Gruppe der älteren Männer mit guter Schlafqualität tritt ein sehr signifikanter positiver Zusammenhang zwischen CAR und Schlafdauer auf. Das würde heißen: je besser die Männer in dieser Gruppe schlafen, desto niedriger ist der Anstieg der Cortisol-Konzentration innerhalb der ersten 30 Minuten nach dem Erwachen. Auch hier gibt es einen deutlichen Unterschied zu den Frauen mit guter Schlafqualität. Nicht nur, dass in dieser Gruppe keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der CAR und der Schlafdauer auftreten, auch die Tendenz des Zusammenhangs ist, anders als bei den älteren Männern mit guter Schlafqualität, negativ.

Auch in der Gruppe der jüngeren Frauen gibt es einen signifikanten Zusammenhang im Zusammenhang mit dem Hormon Cortisol. In dieser Gruppe korreliert die CAR positiv mit dem Chronotyp. Je stärker die jungen Frauen dazu tendieren, ein Morgentyp zu sein, desto geringer ist ihr Speichel-Cortisol-Anstieg innerhalb der ersten 30 Minuten nach dem Erwachen. Dieser Befund deutet wiederum darauf hin, dass Morgentypen das Aufwachen leichter fällt, als den Spättypen. Die Körper von Frühtypen scheinen vor dem eigentlichen Aufwach-Zeitpunkt bereits soweit physiologisch auf den Aufwach-Prozess vorbereitet zu sein, dass das Aufwachen an sich keinen so großen Stressfaktor bedeutet, wie für die Abendtypen.

Auch das Melatonin-Abendprofil wies keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten der drei Probandengruppen auf, obwohl die Melatoninkurve der jüngeren Frauen teilweise deutlich über der der älteren Probanden lag. Auch bezüglich der DLMO-

Schwellenwert-Konzentration und dem Zeitpunkt, zu dem diese erreicht wird, unterschieden sich jüngere und ältere Probanden nicht voneinander. Unterteilt man jedoch die älteren Probandengruppen nach ihrer Schlafqualität, so zeigt sich, dass ältere Männer mit guter Schlafqualität während des gesamten Messzeitraums von 17 bis 24 Uhr mehr Melatonin produzierten, als Männer mit schlechter Schlafqualität. Diese Unterschiede lassen sich um 18 Uhr und um 19 Uhr als signifikant absichern. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das Melatonin, das die physiologische Wirkung hat, müde zu machen, einen wichtigen Faktor für die Schlafqualität der Probanden darstellt. Wenn wenig Melatonin ausgeschüttet wird, schläft der Proband schlechter. Diese Beobachtung einer geringen Melatonin-Konzentration in Zusammenhang mit schlechter Schlafqualität liegt auch bei den älteren Frauen vor. Diese Befunde lassen sich jedoch statistisch nicht absichern.

In mehreren Studien wurde bereits nachgewiesen, dass es altersbedingte Unterschiede in der Stärke der Melatonin-Exkretion gibt, wohingegen die circadiane Rhythmik aufrecht erhalten wird (Mahlberg et al. 2006a, 2006b, van Coevorden et al. 1991). Mahlberg et al. wiesen in einer Studie altersbedingtes Nachlassen der Melatonin-Exkretion nach (Mahlberg et al. 2006a). Sie untersuchten jüngere und ältere Probanden mit guter Schlafqualität. Diese wurde mit Hilfe des PSQI-Fragebogens ermittelt. Eine Punktzahl von >5 galt als Ausschlusskriterium. In der Studie wurden 45 Frauen und 30 Männer im Alter von 20 bis 82 Jahren untersucht. Die Melatonin-Konzentrationen wurden mittels ELISA in Urinproben untersucht. Trotz des Unterschieds im Probenmaterial bestätigt diese Studie somit den Eindruck, dass Melatonin-Konzentrationen bei jüngeren Probanden höher liegen, als bei älteren. Da in der Studie von Mahlberg et al. nur gute Schläfer untersucht wurden, kann diese Studie nicht herangezogen werden, um die Stärke der Melatonin-Synthese von guten und schlechten Schläfern miteinander zu vergleichen. Hierzu eignet sich eine Studie, die von Haimov et al. durchgeführt wurde. Haimov et al. verglichen die Melatonin-Konzentrationen in Urin von jüngeren und älteren guten und schlechten Schläfern. Sie konnten zeigen, dass der Melatonin-Level in der älteren Probandengruppe bei den schlechten Schläfern geringer war als bei den guten Schläfern (Haimov 1994).

Eine Studie, die die Melatonin-Konzentrationen im Speichel von gesunden Probanden unterteilt nach ihrer Schlafqualität untersucht, liegt nach Kenntnis der Autorin bisher nicht vor. Ein Grund dafür, dass die in dieser Studie gezeigten Ergebnisse bezüglich der Melatonin-Syntheserate von jüngeren und älteren guten bzw. schlechten Schläfern nicht als signifikant abgesichert werden konnte, könnte also in der Stichprobengröße begründet sein. Außerdem zeigten Mahlberg et al., dass sowohl die intra-individuelle Variabilität, als auch die inter-individuelle Variabilität der Melatonin-Konzentrationen sehr hoch ist. So wurden zwischen verschiedenen Probanden Unterschiede mit dem Faktor 20 gefunden (Mahlberg et al. 2006a), und intra-individuelle Unterschiede mit einem Faktor von bis zu 10,5. Dies kann

zu einer hohen Standardabweichung, wie sie in dieser Studie bei mehreren Werten vorliegt, führen. Unter dieser Voraussetzung ist eine statistische Absicherung von signifikanten Zusammenhängen schwierig.

Auch zwischen dem Zeitpunkt, zu dem der DLMO-Schwellenwert erreicht wird und dem Chronotypen der Probanden tritt ein statistisch signifikanter Zusammenhang auf. Dieser findet sich in der Gruppe der älteren Frauen mit schlechter Schlafqualität. Das heißt, in der Gruppe der älteren schlechten Schläferinnen tritt der DLMO umso später auf, desto mehr die Frauen dazu neigen, ein Morgentyp zu sein. Dies ist physiologisch sehr ungünstig, denn wenn ein Morgentyp erst spät müde wird, er deshalb auch spät ins Bett geht, wird dies langfristig zu einem Schlafdefizit führen, da der Aufwach-Zeitpunkt trotzdem früh ist. Vergleichsliteratur hierzu liegt nach Kenntnis der Autorin nicht vor.

Zwischen dem DLMO-Schwellenwert und dem Expressionsprofil des Uhrengens *hBMAL1* konnten bei älteren Männern ebenfalls statistisch signifikante Zusammenhänge festgestellt werden. Je höher die Konzentration des DLMO, desto höher war auch die Expression dieses Gens um zwölf Uhr mittags und um 20 Uhr abends. Diese Zeitpunkte flankieren den Zeitpunkt, zu dem die Expressionsrate dieses Gens in der Gruppe der älteren Männer ihr Maximum erreicht hat. Dies kann dahingehend interpretiert werden, dass zu diesen Zeitpunkten ein bestimmtes Verhältnis von Melatonin-Syntheserate und *hBMAL1*-Expressionsrate erreicht wird, welches eine bisher unbekannte physiologische regulative Funktion auslösen kann. Diese Vermutung gilt jedoch in Anbetracht der hier vorliegenden Stichprobengröße nur unter Vorbehalt.

5.3 Unterschiede der circadianen Expression der Uhrengene *hBMAL1* und *hPER1* bei jüngeren und älteren Menschen

Bisher liegen nur wenige Untersuchungen zur Genaktivität von Uhrengenen bei älteren Menschen vor (Ando et al. 2010, Gibson 2009, Gonos 2000). Die vorliegende Studie ergab keine Unterschiede in den Expressionsraten der Uhrengene *hBMAL1* und *hPER1* zwischen älteren und jüngeren Probanden. Dies deutet darauf hin, dass die circadiane Expressionsrhythmik dieser Uhrengene unabhängig von Alter und Geschlecht relativ stabil ist. Entsprechend ergab sich auch kein Zusammenhang zwischen der Expressionsrate der hier untersuchten Uhrengene *hBMAL1* und *hPER1* und der Schlafqualität der Probanden. Darüber hinaus ergaben sich weitere Befunde, die nachfolgend diskutiert werden.

Vergleicht man die Expressionsraten des Gens *hBMAL1* zwischen den drei Probandengruppen jüngere Frauen, ältere Frauen und ältere Männer, so treten keine statistisch signifikanten Mittelwertunterschiede zwischen diesen Gruppen auf. Auch ergeben sich keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen älteren Probanden mit guter vs. schlechter Schlafqualität. Es fällt jedoch auf, dass die tageszeitlichen Expressionskurven bei

Männern und Frauen mit guter Schlafqualität sehr ähnlich verlaufen, wohingegen die Expressionskurven in den Gruppen der schlechten Schläfer davon abweichen. Bevor auf diese Aspekte eingegangen wird, soll der tageszeitliche Expressionsverlauf der beiden Uhrengene kurz dargestellt werden. Bei dem Uhrengen *BMAL1* sinkt die Expression bei Mammalia gegen acht Uhr morgens (Bunney und Bunney 2000, Dunlap 1999). Die Expressionsrate befindet sich tagsüber auf einem relativ niedrigen Level und steigt in den Abendstunden an. Das Expressionsmaximum wird etwa um 20 Uhr erreicht. Dieser Expressionsverlauf konnte in der vorliegenden Arbeit in etwa auch bei den älteren Männern und Frauen mit guter Schlafqualität beobachtet werden. Der beschriebene Verlauf unterscheidet sich jedoch deutlich von dem Verlauf, der bei Probanden mit schlechter Schlafqualität gefunden wurde. Bei den älteren Frauen mit schlechter Schlafqualität erfolgt fast ausnahmslos ein Anstieg der Expressionsrate von acht Uhr morgens bis 24 Uhr abends. Hierbei übersteigt die Expressionsrate zum Messzeitende den Maximalwert der guten Schläfer um etwa das 20-fache. Auch bei den älteren Männern mit schlechter Schlafqualität weicht der Verlauf der mittleren *hBMAL1*-Expressionsrate von der der guten Schläfer ab, allerdings in die andere Richtung. So ist die Expressionsrate innerhalb dieser Probandengruppe zu jedem der untersuchten Zeitpunkte die niedrigste der vier Gruppen. Insgesamt sind die Ratios zu dem Haushaltsgen *h36B4* recht niedrig. Der Wert von 1,00 wird nicht erreicht. Außerdem findet sich das Expressions-Maximum in dieser Gruppe bereits um 16 Uhr und liegt damit zeitlich vor dem der anderen drei Gruppen, insbesondere der guten Schläfer.

Aufgrund dieser Befunde lässt sich vermuten, dass sowohl eine sehr hohe zeitlich rückverlagerte Expression des Gens *hBMAL1* sowie eine sehr niedrige Expression mit vorverlagertem Maximalwert im Zusammenhang mit Schlafstörungen von älteren Personen stehen könnte. Nach Kenntnis der Autorin wurde dieser Zusammenhang in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Vergleicht man die Expressionsverläufe des Uhrengens *hPER1* in den verschiedenen Probandengruppen miteinander, so zeigt sich, dass der Expressionsverlauf in keiner der Gruppen den Literaturangaben entspricht (Dunlap et al. 1999, Bunney und Bunney 2000). Die Verläufe der verschiedenen Probandengruppen weichen alle mehr oder weniger stark von den Literaturangaben ab. Laut Literatur findet sich das Expressions-Minimum des Gens *hPER1* etwa gegen 20 Uhr, und das Maximum wird im Zeitraum von 06:30 bis 9:30 Uhr erreicht. Die jüngere weibliche Probandengruppe ist diejenige, die diesem Schema am ehesten entspricht.

Dies zeigte sich auch bei einer Unterteilung der Probandengruppen nach Geschlecht, Alter oder Schlafqualität. Es ist anzunehmen, dass die mittleren Ratios aufgrund von geringen Probandenzahlen stark von Einzelwerten beeinflusst wurden. Auch die hohen

Standardabweichungen, die eine deutliche interindividuelle Variation anzeigen. Dies könnte durch die Analyse einer größeren Probandengruppe überprüft werden. In dem Zeitraum, in dem die vorliegende Studie durchgeführt wurde, veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Hida einen Artikel, der ebenfalls die Expression von Uhrengenen, darunter auch *hPER1*, im Rahmen von Alternsprozessen handelte (Hida et al. 2009). In dieser Studie wurde bei sechs älteren gesunden Probanden (mittleres Alter 62 Jahre) und acht jüngeren Probanden (mittleres Alter 21 Jahre) über einen Zeitraum von 24 Stunden alle zwei Stunden Blut abgenommen und aus mononucleären Blutzellen (PBMCs) Gen-Expressionsprofile für die drei Gene *hPER1*, *hPER2* und *hPER3* erstellt. Der Vergleich von jüngeren und älteren Probanden erfolgte unter Einbeziehung des individuellen Einschlafzeitpunktes. Es wurde also verglichen, zu welchem Zeitpunkt nach dem Einschlafen das Expressions-Minimum bzw. -Maximum der einzelnen Probanden erreicht wurde. Dies ist insofern von Vorteil, als dass sowohl der Einschlafzeitpunkt als auch der Zeitpunkt des Expressions-Höhepunktes bei den jüngeren Probanden der Studie von Hida im Mittel ein bis zwei Stunden später stattfinden, als bei den älteren Probanden. Unter diesen Voraussetzungen fanden sich keine statistisch signifikanten altersabhängigen Unterschiede in der Expression von *hPER1*. Die Expressions-Maxima des Gens *hPER1* finden in beiden Gruppen, wie erwartet, in den frühen Morgenstunden statt. Hierbei tritt der Maximalwert bei den älteren Probanden um etwa fünf Uhr morgens, und bei den jüngeren Probanden etwa zweieinhalb Stunden später, gegen sieben Uhr, auf. Besonders erwähnenswert sind jedoch die Zeitpunkte, zu denen die Expression des Gens *hPER1* minimal sind. Dies ist bei älteren Probanden gegen 16 Uhr und bei jüngeren Probanden erst um 21:47 Uhr der Fall. Das bedeutet, dass zwischen dem Auftreten der Maximalwerte zwischen diesen beiden Gruppen eine Zeitdifferenz von fast fünf Stunden liegt. Da die Befunde von Hida et al (2009) auf Daten von wenigen Befunden beruhen, müssen auch diese Ergebnisse unter dem Vorbehalt der Stichprobenverschiebung betrachtet werden. Auch ist zu beachten, dass Hida et al. (2009) ihre Untersuchung an Blutzellen durchführten, während die vorliegende Arbeit Mundschleimhaut-Zellen verwendete. Dies kann zu Expressionsunterschieden führen. Trotzdem deutet diese Studie zusammen mit der vorliegenden darauf hin, dass es u.U. eine große Variationsbreite gibt, was den Zeitpunkt von Expressions-Minimum bzw. -Maximum zumindest des Gens *hPER1* betrifft. Damit würde es sich bei den unterschiedlichen Expressions-Verläufen nicht um ein schwer zu erklärendes Phänomen im Rahmen dieser Studie handeln, sondern um ein allgemeines Phänomen, das besonders bei kleinen Probandenzahlen ins Gewicht fällt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Expression von Uhrengenen unabhängig von Alternsprozessen oder Geschlechtsunterschieden eine robuste 24-Stunden-Rhythmik aufweist. Im Rahmen von Alternsprozessen treten jedoch verschiedene Veränderungen im

Verlauf der Körperkerntemperatur auf, und auch die Syntheserate der Hormone Melatonin und Cortisol zeigt Veränderungen. Besonders auffällig ist, dass nahezu keine der in dieser Arbeit gezeigten Veränderungen und Unterschiede für mehrere Gruppen gleichzeitig gelten. Bei älteren Frauen steht beispielsweise eine erhöhte Tagesschläfrigkeit mit einem geringen Anstieg der Cortisol-Konzentration in der ersten Stunde nach dem Erwachen in Zusammenhang. Außerdem gibt es Zusammenhänge zwischen Chronotyp und Schlafdauer sowie Körperkern-Temperatur um acht Uhr morgens und CAR-Wert. Dagegen steht bei jüngeren Frauen der Chronotyp mit dem CAR-Wert in Zusammenhang, und bei älteren Männern mit guter Schlafqualität beispielsweise der morgendliche Cortisol-Anstieg mit der Tagesschläfrigkeit und der Schlafdauer. Dies zeigt nicht nur, dass es altersbedingte Veränderungen der circadianen Rhythmik in den Markersystemen Uhrengen-Expression, Hormonsynthese und Körperkerntemperatur gibt, sondern lässt auch vermuten, dass Alternsprozesse geschlechtsabhängig unterschiedlich verlaufen. Bei weiteren Studien ist dies also zu beachten, und die Interpretation von Ergebnissen u.U. nach Geschlechtern getrennt durchzuführen.

5.4 Methodenkritik

Das Probandenkollektiv

Die wahrscheinlich größte Kritik, die an dieser Studie geübt werden kann, bezieht sich auf die Anzahl der Probanden. Insgesamt nahmen 44 Probanden teil. Diese ließen sich in die drei Gruppen „ältere Männer“, „ältere Frauen“ und „jüngere Frauen“ unterteilen, wobei die beiden erstgenannten Gruppen je nach Auswertungskriterium noch in die Untergruppen „gute Schläfer“ und „schlechte Schläfer“ eingeteilt wurden. Hierdurch wurde die Anzahl der Probanden in den Untergruppen klein, sodass eine statistische Auswertung teilweise nicht mehr sinnvoll erschien. Weiterhin zeigt sich eine relativ große Streuung innerhalb der Werte verschiedener Variablen, was sich in meist sehr hohen Standardabweichungen ausdrückt. Dieses Vorgehen war jedoch für die Auswertung der Daten nach den Gesichtspunkten „Alter“, „Geschlecht“ und „Schlafqualität“ nötig. Weiterhin wäre es im Rahmen einer zeitlich begrenzten Doktorarbeit nicht möglich gewesen, eine wesentlich höhere Anzahl von Probanden zu untersuchen, da ein relativ vielfältiges Methodenspektrum angewandt wurde. Zudem war es ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit, die Expressionsanalyse zu etablieren.

Weiterhin ist festzuhalten, dass die vorgelegten Ergebnisse nicht repräsentativ für die deutsche Bevölkerung sind. Es handelt sich um eine bewusst selektive Stichprobe. In dieser Studie ging es um gesundes Altern. Bettlägerigkeit oder Multimorbidität wurden deshalb ausgeschlossen.

Außerdem ist es grundsätzlich sinnvoll, definierte Gruppen in einer begrenzten Anzahl von Merkmalen miteinander zu vergleichen, um erste Hinweise auf unbekannte Zusammenhänge zu erhalten, wie es hier geschehen ist. Die Ergebnisse sind also auf ein vergleichbares Probandenkollektiv übertragbar.

Die genannten Kritikpunkte beziehen sich hauptsächlich auf die Anzahl der Probanden. Die Zusammenhänge, die in dieser Studie erkannt wurden, müssen davon nicht beeinflusst sein.

Die RNA-Extraktion

Ein weiterer wichtiger Kritikpunkt liegt bei der RNA-Extraktion. Die verwendete RNA wurde aus Mundschleimhaut extrahiert. Grundsätzlich befinden sich im Mund des Menschen auch Bakterien und Schleimstoffe. Dies kann dazu führen, dass einerseits die RNA-Extraktion nicht so effektiv vonstatten gehen kann, wie es bei der Verwendung von Blut als Ausgangsmaterial der Fall ist. Andererseits ist auch die Wahrscheinlichkeit groß, ebenfalls bakterielle RNA zu extrahieren und anschließend auch in cDNA mit umzuschreiben. Dies könnte dann die Amplifikation der humanen Gene stören bzw. es könnten Artefakte entstehen. Um dies zu verhindern, wurde eine enzymatische Spaltung der gDNA, die sich nach der RNA-Extraktion zunächst noch im Ansatz befand, vorgenommen. Außerdem wurden intronüberspannende Oligonukleotide verwendet, die an humanen Sequenzen entworfen wurden. So konnte die Möglichkeit der Artefaktbildung während der PCR auf ein Minimum reduziert werden.

Der Freiburger Fragebogen

Einer der Fragebögen, die während dieser Arbeit Anwendung fanden, ist der Freiburger Fragebogen zur körperlichen Aktivität. Er hat sehr viele Vorteile, die im Methodenteil bereits beschrieben wurden, und hier nicht noch einmal wiederholt werden sollen. Ein Nachteil dieses Fragebogens ist jedoch, dass man bei seiner Verwendung von dem Kompendium abhängig ist, das von der Arbeitsgruppe um Ainsworth et al. herausgegeben wurde (Ainsworth et al. 1993, Ainsworth et al. 2000). In diesem Kompendium finden sich die METs, die verschiedenen körperlichen Aktivitäten zugeordnet wurden. Seit der Erweiterung im Jahre 2000 ist dieses Kompendium sehr umfangreich. Nichts desto trotz kann es immer vorkommen, dass ein Proband beispielsweise einer Sportart nachgeht, die in diesem Kompendium nicht aufgeführt ist. In diesem Falle hat der Untersuchende entweder die Möglichkeit, selbst zu ermitteln, wie hoch der Energieumsatz des Probanden während der Durchführung dieses Sports ist, was u.U. schwierig sein kann, oder er wählt einen Wert aus dem Kompendium von einer Sportart, die der des Probanden am nächsten kommt.

Die Melatonin-Analyse

Für die Bestimmung der Melatonin-Konzentrationen im Speichel der Probanden wurde das Kit „Non-Extraction Melatonin SALiva ELISA“ der Firma IBL International verwendet. Dieses Kit hatte seine Markteinführung während dieser Studie im Jahr 2007. Es zeigte sich, dass die zunächst geliefereten Standards ein zu geringes Konzentrations-Spektrum abdeckten. Dadurch konnte keine Standardkurve errechnet werden, mit der die höheren Melatonin-Konzentrationen bestimmt werden konnten. Der Hersteller besserte nach und erweiterte die Konzentrationen seiner Standards. Für besonders hohe Melatonin-Konzentrationen im Speichel reicht dieses Spektrum jedoch noch immer nicht aus. Für diese Fälle empfiehlt die Firma, den Speichel mit dem Puffer A zu verdünnen, der einer Leerprobe entspricht. Dieses Vorgehen bringt jedoch mehrere Nachteile mit sich. Erstens dauert die Durchführung eines solchen ELISAs etwa 20 bis 24 Stunden, und eine Wiederholung kostet die entsprechende Zeit. Zweitens muss für solche Fälle immer genug Probenmaterial vorhanden sein. Und drittens kann selbst bei einer Verdünnung nicht davon ausgegangen werden, dass der Versuch daraufhin klappt, weil man vor dem Verdünnungsschritt nicht weiß, wie stark die Verdünnung sein muss. Eine zu geringe Verdünnung führt dazu, dass die Bestimmung ein weiteres Mal vorgenommen werden muss, was zeit- und kostenintensiv ist. Eine zu hohe Verdünnung sollte vermieden werden, weil der Konzentrationsbereich, in dem das Melatonin im Speichel nachgewiesen werden soll, im Picogramm pro Milliliter-Bereich liegt. Es handelt sich also um einen sehr sensitiven Bereich, bei dem eine Verdünnung durchaus zu einem Verdünnungsfehler führen kann, der die Werte verfälscht.

5.5 Ausblick

In mehreren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die circadiane Rhythmik großen Einfluss auf fast alle Bereiche unseres Lebens hat. Die Untersuchung von biologischen Rhythmen, speziell circadianen Rhythmen, spielt deshalb auch in der Forschung eine immer wichtigere Rolle. Besonders physiologische Gegebenheiten bei Schichtarbeit und Jetlag, psychologische Auswirkungen bei gestörten circadianen Rhythmen und Ursachenforschung an verschiedenen Krankheiten standen hierbei oft im Mittelpunkt des Interesses. Auch die Chronopharmakologie sei hier als Beispiel genannt. Gerade diese kann zukünftig im Zusammenhang mit Alternsprozessen beim Menschen eine große Rolle spielen. Die Bevölkerungsentwicklung in unserer Gesellschaft führt zu einem immer größer werdenden Anteil an älteren Menschen. Diese neigen grundsätzlich eher zu Krankheiten als jüngere Personen. Gerade „Wohlstandskrankheiten“ wie Adipositas, Bluthochdruck und Diabetes sind hier zu nennen. Die Tatsache, dass sich physiologische Gegebenheiten im Körper im Laufe von 24 Stunden verändern, legt nahe, dass auch die Aufnahme und Wirkungsintensität von Pharmazeutika über den Tag hinweg veränderlich ist (Ohdo 2010). Die

Chronopharmakologie forscht daran, Medikamenten-Dosierung und Einnahme-Zeitpunkt an jeden Patienten individuell anpassen zu können, da dies zu geringeren Wirkstoff-Belastungen des Körpers führen könnte.

Die Untersuchung von weiteren Uhrgenen wie *hCLOCK*, *hTIM*, *hCRY* oder *hPER2* und *hPER3* am gleichen oder einem ähnlichen Probandenkollektiv wie dem, das in dieser Studie vorlag, könnte ebenfalls sehr aufschlussreich sein. Da die durch diese Gene kodierten Proteine t.w. mit den Proteinen der bereits in dieser Studie untersuchten Genprodukten interagieren, kann die veränderte Expression eines Gens die komplette negative Rückkopplungsschleife beeinflussen. Kenntnisse hierüber würden unter Umständen eine Normalisierung des circadianen Rhythmus von Patienten ermöglichen. Häufig leiden Patienten unter einem psychologischen Druck, wenn die Aufrechterhaltung von sozialen Kontakten durch einen verschobenen circadianen Rhythmus erschwert ist. Diesen Patienten könnte so geholfen werden.

Die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen könnte ebenfalls viele wichtige Informationen liefern. So wäre eine Fragestellung, ob verschiedene Gen-Varianten, also unterschiedliche Allele oder SNPs, die zu einem veränderten Protein führen, eine quantitativ veränderte Protein-Protein-Bindung innerhalb der negativen Rückkopplungsschleifen, und somit auch eine veränderte Genexpression, zur Folge haben.

Weiterhin interessant wäre eine Wiederholungsstudie, um die statistischen Werte mit Hilfe von weiteren Daten zu erweitern, oder eine Wiederholungsstudie, die während des Winters stattfindet. Die für die vorliegende Studie verwendeten Mundschleimhaut- und Speichelproben wurden im Zeitraum von Mai bis September, also in den Sommermonaten, gesammelt. Die externen Zeitgeber Licht und Temperatur sind in den Wintermonaten anders ausgeprägt. Es wäre vorstellbar, dass Probanden in den Wintermonaten beispielsweise Fragebögen anders ausfüllen, da sie ein verändertes Allgemeinbefinden aufweisen. Dies gilt besonders im Zusammenhang mit SAD. Speziell wäre interessant, ob die PSQI- und SPAQ-Fragebögen von den Probanden in gleicher Weise ausgefüllt würden, wie in den Sommermonaten. Außerdem wäre es möglich, dass der Freiburger Fragebogen zur körperlichen Aktivität andere Ergebnisse liefert, da dieser Fragebogen Aktivitäten wie „Sind Sie in der letzten Woche Fahrrad gefahren“ oder „Wenn Sie einen Garten haben: wie viele Stunden haben Sie in der letzten Woche dort verbracht?“ enthält. Bei einem hohen Anteil des Probandenkollektivs ist also bei diesem Fragebogen im Sommer ein anderer Aktivitätsumsatz zu erwarten als im Winter. In einer kürzlich erschienenen Studie konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl der Zeitpunkt des DLMO, als auch der Schlafbeginn in den Frühlingsmonaten später einsetzen, als in den Wintermonaten und dass die Schlafdauer im Winter kürzer ist als im Frühling (Figueiro und Rea 2010). Dies deutet darauf hin, dass auch in anderen in dieser Studie untersuchten Variablen jahreszeitlich bedingte

Diskussion

Unterschiede auftreten könnten. Schließlich wäre es bei einer Wiederholungsstudie sinnvoll, den Aufenthalt der Probanden in einem Schlaflabor einzubeziehen. Hierdurch könnten Erkenntnisse über einen Zeitraum gewonnen werden, der während der vorliegenden Studie nicht abgedeckt werden konnte. Beispielsweise wäre es interessant, die Verläufe von Genexpressionen und Melatonin-Synthese von guten und schlechten Schläfern auch im Zeitraum von 24 Uhr abends bis acht Uhr morgens zu dokumentieren.

6 Zusammenfassung

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine Querschnittsstudie an 44 Probanden aus dem Raum Kiel, die sich mit der Untersuchung von circadianen Markersystemen (Körperkerntemperatur, Uhrengene, Hormone) beschäftigte. Von den 44 adulten Probanden waren 14 männlich und älter als 60 Jahre ($68,29 \pm 2,95$ Jahre), 20 weiblich und älter als 60 Jahre ($67,90 \pm 5,12$ Jahre) und 10 weiblich und jünger als 30 Jahre ($25,70 \pm 1,83$ Jahre). Es wurden mehrere Fragestellungen untersucht. So sollte überprüft werden, ob es Unterschiede in der Rhythmik von Körperkerntemperatur, Hormonsynthese, Uhrengene-Expression und Schlafqualität zwischen jüngeren und älteren Menschen gibt. Weiterhin sollten etwaige Geschlechtsunterschiede zwischen älteren Menschen in Bezug auf die genannten circadianen Markersysteme, auch im Zusammenhang mit der Schlafqualität der Probanden, aufgezeigt werden.

Anhand von Fragebögen machten die Probanden allgemeine Angaben, Angaben zu ihrer Schlafqualität (Pittsburg Sleep Quality Index), zum Auftreten von Tagesschläfrigkeit (Epworth Sleepiness Scale), ihrem Chronotyp (deutsche Version des Morningness-Eveningness-Questionnaire) sowie zu evtl. auftretender saisonaler Depression (Seasonal Pattern Assessment Questionnaire). Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden den Probanden zu festgelegten Zeitpunkten Mundschleimhaut- und Speichelproben entnommen. Anhand dieser wurden einerseits mittels Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (PCR) auf dem LightCycler[®] Expressionsprofile der Uhrengene *hBMAL1* und *hPER1* erstellt, andererseits mit Hilfe von Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISAs) die Syntheserate der Hormone Cortisol und Melatonin über bestimmte Zeiträume hinweg charakterisiert. Diese Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Anhand der im ELISA erhaltenen Ergebnisse wurden Kenngrößen wie die Cortisol-Aufwachreaktion (CAR) und der Dim Light Melatonin Onset (DLMO) berechnet. Weiterhin wurden Körperkerntemperaturprofile der Probanden erstellt. Mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS (Version 15.0) wurden Kenngrößen und Parameter errechnet, und die Variablen zueinander in Beziehung gesetzt, um Erkenntnisse über die Beeinflussung der Markersysteme untereinander und durch exogene Faktoren zu gewinnen. Aber auch Veränderungen im Rahmen von Alternsprozessen und der Einfluss auf die Schlafqualität der älteren Probanden wurde untersucht.

Die Ergebnisse ergaben signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen in allen circadianen Markersystemen. Während sich die Syntheseraten der Hormone Cortisol und Melatonin hauptsächlich in den Gruppen unterschieden, die nach der Schlafqualität gebildet wurden, fanden sich bei den Genexpressionen und den Temperaturverläufen eher geschlechts-oder altersabhängige Unterschiede. Damit konnte nicht nur gezeigt werden, dass es altersbedingte Veränderungen der circadianen Rhythmik in den Markersystemen

Zusammenfassung

Uhren-Expression, Hormonsynthese und Körperkerntemperatur gibt, sondern es wurden auch Hinweise darauf gefunden, dass Alternsprozesse bei den verschiedenen Geschlechtern unterschiedlich ablaufen.

7 Summary

Within this study, 44 adult probands from the area of Kiel, Germany, were examined concerning circadian marker systems (bodytemperature, clock genes, hormones). The 44 probands consisted of 14 men, who were older than 60 years (mean age $68,29 \pm 2,95$ yrs.), 20 women who were older than 60 years (mean age $67,90 \pm 5,12$ yrs.) and ten women younger than 30 years ($25,70 \pm 1,83$ yrs.). Within this study, the following questions should be examined: Is there a difference in rhythmicity of core body temperature, hormone synthesis, clock gene expression and sleep quality between younger and older adults? Are there sex differences within the group of older people concerning the mentioned circadian marker systems?

By means of Questionnaires, probands gave general information, information about their sleep quality (Pittsburg Sleep Quality Index), the appearance of daytime sleepiness (Epworth Sleepiness Scale), their chronotype (Morningness-Eveningness-Questionnaire) and the appearance of seasonal affective disorder (Seasonal Pattern Assessment Questionnaire). For molecular analysis saliva and oral mucosa was collected at fixed timepoints. With the help of these samples, real-time polymerase chain reactions (PCR) were performed on the LightCycler[®] Instrument, and expression Profiles of the clock genes *hBMAL1* and *hPER1* were generated. On the other hand, synthesis rate of the hormones Cortisol and Melatonin was determined over defined time periods using Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISAs). On the basis of ELISA-results, parameters such as Cortisol-Awakening-Response (CAR) and Dim Light Melatonin Onset (DLMO) were calculated. Additionally, bodytemperature-profiles were established.

By using the statistical program SPSS (version 15.0), parameters were calculated and variables were correlated in order to get information about affects between the markersystems and effects of exogen factors. Also, changes depending on aging-processes and the influence on sleep quality were examined.

All methods that were used during this study, were established in the department of Human Biology of the Zoological Institute of the Christian Albrechts University Kiel at first.

It was observed, that there were statistically significant differences between the groups in all circadian marker systems. While synthesis-levels of the hormones Cortisol and Melatonin seem to differ mostly between good sleepers and bad sleepers, gene expression and temperatureprofiles show differences in groups dependent on sex or age.

8 Literaturverzeichnis

- Ainsworth BE, Haskell WL, Leon AS, Jacobs DR Jr, Montoye HJ, Sallis JF, Pfaffenbarger RS (1993).** Jr Compendium of physical activities: classification of energy costs of human physical activities. *Med Sci Sports Exerc.* (1):71-80
- Ainsworth BE, Haskell WL, Whitt MC, Irwin ML, Swartz AM, Strath SJ, O'Brien WL, Bassett DR Jr, Schmitz KH, Emplaincourt PO, Jacobs DR Jr, Leon AS (2000).** Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities. *Med Sci Sports Exerc.* 32:498-504
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2004).** *Molekularbiologie der Zelle.* 4. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH, 1800 S.
- Ancoli-Israel S, Martin JL, Kripke DF, Marler M, Klauber MR (2002).** Effect of light treatment on sleep and circadian rhythms in demented nursing home patients. *J Am Geriatr Soc.* 50(2):282-289
- Ando H, Ushijima K, Kumazaki M, Takamura T, Yokota N, Saito T, Irie S, Kaneko S, Fujimura A (2010).** Influence of age on clock gene expression in peripheral blood cells of healthy women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 65(1):9-13
- Ando H, Ushijima K, Kumazaki M, Takamura T, Yokota N, Saito T, Irie S, Kaneko S, Fujimura A (2010).** Influence of age on clock gene expression in peripheral blood cells of healthy women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.*(1):9-13
- Archer SN, Robilliard DL, Skene DJ, Smits M, Williams A, Arendt J, von Schantz M (2003).** A length polymorphism in the circadian clock gene *Per3* is linked to delayed sleep phase syndrome and extreme diurnal preference. *Sleep.* 26(4):413-415
- Aschoff J (1952).** Aktivitätsperiodik von Mäusen im Dauerdunkel. *Pflügers Archiv,* 255: 189-196
- Aschoff J (1955).** Der Tagesgang der Körperkerntemperatur beim Menschen. *Klin Wochenschr.* 33(23-24):545-551
- Aschoff J (1965).** Circadian Rhythms in man. *Science.* 148:1427-1432
- Aschoff J, v. Saint Paul U, Weaver R (1971).** Die Lebensdauer von Fliegen unter dem Einfluß von Zeit-Verschiebungen. *Naturwissenschaften,* 58 (11):574
- Aschoff, J, Gerecke, U, Weaver, R (1967).** Phasenbeziehungen zwischen den circadianen Perioden der Aktivität und der Kerntemperatur beim Menschen. *Pflügers Archiv* 295: 173-183
- Benington JH, Heller HC (1995).** Restoration of brain energy metabolism as the function of sleep. *Prog Neurobiol.* 45(4):347-360
- Bjarnason GA, Jordan RCK, Wood PA, Li Q, Lincoln DW, Sothorn RB, Hrushesky WJM, Ben-David Y (2001).** Circadian Expression of Clock Genes in Human Oral Mucosa and Skin:

Association with Specific Cell-cycle Phases. *A J Pathol.* 158(5):1793-1801

Bligh J, Johnson KG (1973) Glossary of terms for thermal physiology. *J Appl Physiol.* 35(6):941-961.

Block GD, Wallace SF (1982). Localization of a Circadian Pacemaker in the Eye of a Mollusc, *Bulla*. *Science.* 217(4555):155-157.

Breslauer KJ, Frank R, Blöcker H, Marky LA (1986). Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(11):3746-3750.

Brezinová V (1976). Duration of EEG sleep stages in different types of disturbed night sleep. *Postgrad Med J.*;52(603):34-36

Brown SA, Kunz D, Dumas A, Westermark PO, Vanselow K, Tilmann-Wahnschaffe A, Herzel H, Kramer A (2008). Molecular insights into human daily behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(5):1602-1607

Bühl A (2008). SPSS 16. 11, aktualisierte Auflage. München: Pearson Studium, 888 S.

Bunney JN, Potkin SG (2008). Circadian abnormalities, molecular clock genes and chronobiological treatments in depression. *Br Med Bull.* 86:23-32.

Bunney WE, Bunney BG (2000). Molecular clock genes in man and lower animals: Possible Implications for Circadian Abnormalities in Depression. *Neuropsychopharmacology* 22(4): 335-345

Bünning E (1963). Die physiologische Uhr: Zeitmessung in Organismen mit ungefähr tagesperiodischen Schwingungen. 2. verb. und erw. Auflage. Berlin: Springer, 153 S.

Burgess HJ, Fogg LF (2008). Individual differences in the amount and timing of salivary melatonin secretion. *PLoS One* 26;3(8):e3055

Burgess HJ, Sletten T, Savic N, Gilbert SS, Dawson D (2001). Effects of bright light and melatonin on sleep propensity, temperature, and cardiac activity at night. *J Appl Physiol.* 91(3):1214-1222

Buysse DJ, Reynolds CF 3rd, Monk TH, Berman SR, Kupfer DJ (1989). The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Res.* 28(2):193-213.

Campbell SS, Zulley J (1989). Evidence for circadian influence on human slow wave sleep during daytime sleep episodes. *Psychophysiology.* 26(5):580-585.

Carrier J, Monk TH, Buysse DJ, Kupfer DJ (1997). Sleep and morningness-eveningness in the 'middle' years of life (20-59 y). *J Sleep Res.* 6(4):230-237.

Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM (1985). Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep.* 100(2):126-131

Cassone VM, Natesan AK (1997). Time and time again: the phylogeny of melatonin as a transducer of biological time. *J Biol Rhythms.* 12(6):489-497

- Cermakian N, Sassone-Corsi P (2000).** Multilevel regulation of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol.*;1(1):59-67
- Chabot CC, Kent J, Watson WH (2004).** Circatidal and Circadian Rhythms of Locomotion in *Limulus polyphemus*. *Biol. Bull.* 207: 72–75
- Chemineau P, Guillaume D, Migaud M, Thiéry JC, Pellicer-Rubio MT, Malpoux B (2008).** Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications. *Reprod Domest Anim.* 43 Suppl 2:40-47
- Chen JD, Lin YC, Hsiao ST (2010).** Obesity and high blood pressure of 12-hour night shift female clean-room workers. *Chronobiol Int.* 27(2):334-344
- Chen KM, Chen MH, Chao HC, Hung HM, Lin HS, Li CH (2009).** Sleep quality, depression state, and health status of older adults after silver yoga exercises: cluster randomized trial. *Int J Nurs Stud.* 46(2):154-163
- Colin J, Timbal J, Boutelier C, Houdas Y, Siffre M (1968).** Rhythm of the rectal temperature during a 6-month free-running experiment. *J Appl Physiol.* 25(2):170-176
- Collins KJ, Exton-Smith AN, Doré C (1981).** Urban hypothermia: preferred temperature and thermal perception in old age. *Br Med J (Clin Res Ed).* 282(6259):175-177
- Cowen PJ, Bevan JS, Gosden B, Elliott SA (1985).** Treatment with beta-adrenoceptor blockers reduces plasma melatonin concentration. *Br J Clin Pharmacol.* 19(2):258-260
- Crocker A, Sehgal A (2010).** Genetic analysis of sleep. *Genes Dev.* 24(12):1220-1235
- Czeisler CA, Duffy JF, Shanahan TL, Brown EN, Mitchell JF, Rimmer DW, Ronda JM, Silva EJ, Allan JS, Emens JS, Dijk DJ, Kronauer RE (1999).** Stability, precision, and near-24-hour period of the human circadian pacemaker. *Science.* 284(5423):2177-2181
- Davis S, Mirick DK, Stevens RG (2001).** Night shift work, light at night, and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 93(20):1557-1562
- de Castro Toledo Guimaraes LH, de Carvalho LB, Yanaguibashi G, do Prado GF (2008).** Physically active elderly women sleep more and better than sedentary women. *Sleep Med.* 9(5):488-493
- Dockray S, Bhattacharyya MR, Molloy GJ, Steptoe A (2008).** The cortisol awakening response in relation to objective and subjective measures of waking in the morning. *Psychoneuroendocrinology.* 33(1):77-82
- Doi Y, Minowa M, Uchiyama M, Okawa M (2001).** Subjective sleep quality and sleep problems in the general Japanese adult population. *Psychiatry Clin Neurosci.* 55(3):213-215
- Dunlap JC (1993).** Genetic analysis of circadian clocks. *Annu Rev Physiol.* 55:683-728
- Dunlap JC (1999).** Molecular Bases for Circadian Clocks. *Cell* 96: 271–290
- Esquirol Y, Bongard V, Mabile L, Jonnier B, Soulat JM, Perret B (2009).** Shift work and metabolic syndrome: respective impacts of job strain, physical activity, and dietary rhythms. *Chronobiol Int.* 26(3):544-559

- Fietze I, Strauch J, Holzhausen M, Glos M, Theobald C, Lehnkering H, Penzel T (2009).** Sleep quality in professional ballet dancers. *Chronobiol Int.* 26(6):1249-1262
- Fleissner G (1996)** Rhythmicität, zirkadiane Rhythmik und Schlaf. In: Dudel J, Menzel R, Schmidt RF (Hrsg.) *Neurowissenschaft.* Berlin: Springer-Verlag, S. 519-537
- Fleissner G, Heinrichs S (1982).** Neurosecretory cells in the circadian-clock system of the scorpion, *Androctonus australis*. *Cell Tissue Res.* 224(1):233-238
- Frey I, Berg A, Grathwohl D, Keul J (1999).** Freiburger Fragebogen zur körperlichen Aktivität- Entwicklung, Prüfung und Anwendung. *Soz.-Präventivmed.* 44: 55-64
- Gallego M, Virshup DM (2007).** Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(2):139-148
- Gander PH, Connell LJ, Graeber RC (1986).** Masking of the circadian rhythms of heart rate and core temperature by the rest-activity cycle in man. *J Biol Rhythms.* 1(2):119-135
- Gander PH, Macdonald JA, Montgomery JC, Paulin MG (1991).** Adaptation of sleep and circadian rhythms to the Antarctic summer: a question of zeitgeber strength. *Aviat Space Environ Med.*;62(11):1019-1025
- Geliebter A, Gluck ME, Tanowitz M, Aronoff NJ, Zammit GK (2000).** Work-shift period and weight change. *Nutrition.* 16(1):27-29
- Gibson EM, Williams WP 3rd, Kriegsfeld LJ (2009).** Aging in the circadian system: considerations for health, disease prevention and longevity. *Exp Gerontol.* 44(1-2):51-56
- Gold DR, Rogacz S, Bock N, Tosteson TD, Baum TM, Speizer FE, Czeisler CA (1992).** Rotating shift work, sleep, and accidents related to sleepiness in hospital nurses. *Am J Public Health.* 82(7):1011-1014
- Gonos ES (2000).** Genetics of aging: lessons from centenarians. *Exp Gerontol.* 35(1):15-21
- Gooley JJ, Rajaratnam SM, Brainard GC, Kronauer RE, Czeisler CA, Lockley SW (2010).** Spectral responses of the human circadian system depend on the irradiance and duration of exposure to light. *Sci Transl Med.* 2(31):31ra33
- Gooneratne NS, Metlay JP, Guo W, Pack FM, Kapoor S, Pack AI (2003).** The validity and feasibility of saliva melatonin assessment in the elderly. *J Pineal Res.* 34(2):88-94
- Grandner MA, Kripke DF, Naidoo N, Langer RD (2010).** Relationships among dietary nutrients and subjective sleep, objective sleep, and napping in women. *Sleep Med.* (2):180-184
- Griefahn B, Robens S (2010).** Experimental studies on the effects of nocturnal noise on cortisol awakening response. *Noise Health.* 12(47):129-136
- Griefahn B., Künemund C., Bröde P., Mehnert P (2001).** Zur Validität der deutschen Übersetzung des Morningness-Eveningness-Questionnaires von Horne und Östberg. *Somnologie* 5:71-80
- Gwinner E (1981).** Circannuale Rhythmen bei Tieren und ihre photoperiodische

Synchronisation. *Naturwissenschaften* 68(11):542-551

Haimov I, Laudon M, Zisapel N, Souroujon M, Nof D, Shlitner A, Herer P, Tzischinsky O, Lavie P (1994). Sleep disorders and melatonin rhythms in elderly people. *BMJ*. 309 (6948):167

Hansen J (2001). Light at night, shiftwork, and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst*. 93(20):1513-1515

Hastings MH (1997). Central clocking. *Trends Neurosci*. 20(10):459-464

Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295(5557):1065-1070

Hida A, Kusanagi H, Satoh K, Kato T, Matsumoto Y, Echizenya M, Shimizu T, Higuchi S, Mishima K (2009). Expression profiles of PERIOD1, 2, and 3 in peripheral blood mononuclear cells from older subjects. *Life Sci*. 84(1-2):33-37

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88(16):7276-7280

Horne JA, Östberg O (1976). A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *Int. J. of Chronobiology* 4, 97-110

Irwin MR, Olmstead R, Motivala SJ (2008). Improving sleep quality in older adults with moderate sleep complaints: A randomized controlled trial of Tai Chi Chih. *Sleep*. 31(7):1001-1008

Janson C, Gislason T, Boman G, Hetta J, Roos BE (1990). Sleep disturbances in patients with asthma. *Respir Med*. 84(1):37-42

Johns MW (1991). A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep* 14(6):540-545

Johns MW (1994). Sleepiness in different situations measured by the Epworth Sleepiness Scale. *Sleep* 17:703-710

Jones CR, Campbell SS, Zone SE, Cooper F, DeSano A, Murphy PJ, Jones B, Czajkowski L, Ptáček LJ (1999). Familial advanced sleep-phase syndrome: A short-period circadian rhythm variant in humans. *Nat Med*. 5(9):1062-1065

Kasper S, Wehr TA, Bartko J, Gaist PA, Rosenthal NE (1989). Epidemiological findings of seasonal changes in mood and behaviour. *Arch. Gen. Psychiatry* 46: 823-833

Kasper S, Wehr TA, Bartko JJ, Gaist PA, Rosenthal NE (1989). Epidemiological findings of seasonal changes in mood and behavior. A telephone survey of Montgomery County, Maryland. *Arch Gen Psychiatry* 46(9):823-833

Kasper S. (1991). Jahreszeit und Befindlichkeit in der Allgemeinbevölkerung (eine Mehrebenenuntersuchung zur Epidemiologie, Biologie und therapeutischen

Beeinflussbarkeit (Lichttherapie) saisonaler Befindlichkeitsschwankungen.) Berlin: Springer, 127 S.

Katzenberg D, Young T, Finn L, Lin L, King DP, Takahashi JS Mignot E (1998). A CLOCK Polymorphism Associated with human diurnal Preference. *Sleep* 21 (6) 569-576

Kelly TL, Neri DF, Grill JT, Ryman D, Hunt PD, Dijk DJ, Shanahan TL, Czeisler CA (1999). Nonentrained circadian rhythms of melatonin in submariners scheduled to an 18-hour day. *J Biol Rhythms*.14(3):190-196

Kleitman N., Titelbaum S., Hoffmann H (1937). The establishment of the diurnal temperature cycle. *Am J Physiol* 119 (1), 48-54

Klevecz RR, Shymko RM, Blumenfeld D, Braly PS (1987). Circadian gating of S phase in human ovarian cancer. *Cancer Res.* 47(23):6267-6271

Konopka RJ, Benzer S (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 68(9):2112-2116

Kubo T, Ozasa K, Mikami K, Wakai K, Fujino Y, Watanabe Y, Miki T, Nakao M, Hayashi K, Suzuki K, Mori M, Washio M, Sakauchi F, Ito Y, Yoshimura T, Tamakoshi A (2006). Prospective cohort study of the risk of prostate cancer among rotating-shift workers: findings from the Japan collaborative cohort study. *Am J Epidemiol.* 164(6):549-555

Lee KA (1988). Circadian Temperature Rhythms in Relation to Menstrual Cycle Phase *J Biol Rhythms* 3: 255

Leibenluft E, Feldman-Naim S, Turner EH, Schwartz PJ, Wehr TA (1996). Salivary and plasma measures of dim light melatonin onset (DLMO) in patients with rapid cycling bipolar disorder. *Biol Psychiatry.* 40(8):731-735

Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 4(6):357-362

Lockley SW, Brainard GC, Czeisler CA (2003).High sensitivity of the human circadian melatonin rhythm to resetting by short wavelength light. *J Clin Endocrinol Metab.* 88(9):4502-4505

Maciel FE, Geihs MA, Vargas MA, Cruz BP, Ramos BP, Vakkuri O, Meyer-Rochow VB, Maia Nery LE, Allodi S (2008). Daily variation of melatonin content in the optic lobes

Mahlberg R, Kunz D (2006b). Melatonin excretion levels and polysomnographic sleep parameters in healthy subjects and patients with sleep-related disturbances. *Sleep Med.* 8(5):512-516

Mahlberg R, Tilmann A, Salewski L, Kunz D (2006a). Normative data on the daily profile of urinary 6-sulfatoxymelatonin in healthy subjects between the ages of 20 and 84. *Psychoneuroendocrinology.* 31(5):634-641

Malakouti SK, Foroughan M, Nojomi M, Ghalebani MF, Zandi T (2009). Sleep patterns,

sleep disturbances and sleepiness in retired Iranian elders. *Int J Geriatr Psychiatry*. (11):1201-1208

Markwald RR, Lee-Chiong TL, Burke TM, Snider JA, Wright KP Jr (2010). Effects of the melatonin MT-1/MT-2 agonist ramelteon on daytime body temperature and sleep. *Sleep*. 1;33(6):825-831

Mathew L, Purkayastha SS, Singh R, Sen Gupta J (1986). Influence of aging in the thermoregulatory efficiency of man. *Int J Biometeorol*.30(2):137-145

Mauritz RP, Mouritzen P, Pfundheller HM, Tolstrup N, Lomholt C (2005). Universal ProbeLibrary Set: One Transcriptome - One Kit. *Biochemica* 2: 22-24.

Maywood ES, O'Brien JA, Hastings MH (2003). Expression of mCLOCK and other circadian clock-relevant proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei. *J Neuroendocrinol*. 15(4):329-334

Michel S, Geusz ME, Zaritsky JJ, Block GD (1993). Circadian rhythm in membrane conductance expressed in isolated neurons. *Science* 259(5092):239-241

Mirmiran M, Kok JH (1987). Circadian rhythms in early human development. *Early Human Development* 26 (2):121-128

Morita T, Tokura H (1996). Effects of lights of different color temperature on the nocturnal changes in core temperature and melatonin in humans. *Appl Human Sci*. 15(5):243-246

Moyes CD und Schulte PM (2008). Tierphysiologie. München: Pearson Studium, 1357 S.

Mullis KB, Faloona FA (1987).. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 155:335-350

Münch M, Cajochen C, Wirz-Justice A (2005). Schlaf und zirkadiane Rhythmik im Alter. *Z Gerontol Geriatr*. 38 Suppl 1:121-23

Myers BL, Badia P (1995). Changes in circadian rhythms and sleep quality with aging: mechanisms and interventions. *Neurosci Biobehav Rev*. 19(4):553-571

Nagtegaal E, Peeters T, Swart W, Smits M, Kerkhof G, van der Meer G (1998). Correlation between concentrations of melatonin in saliva and serum in patients with delayed sleep phase syndrome. *Ther Drug Monit*. 20(2):181-183

Nakazawa Y, Nonaka K, Nishida N, Hayashida N, Miyahara Y, Kotorii T, Matsuoka K (1991). Comparison of body temperature rhythms between healthy elderly and healthy young adults. *Jpn J Psychiatry Neurol*. (1):37-43

O'Connor PJ, Youngstedt SD (1995). Influence of exercise on human sleep. *Exerc Sport Sci Rev*. 23:105-134

Ohayon MM, Zully J, Guilleminault C, Smirne S, Priest RG (2001). How age and daytime activities are related to insomnia in the general population: consequences for older people. *J Am Geriatr Soc*. 49(4):360-366

Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, Schultz PG, Kay SA,

- Takahashi JS, Hogenesch JB (2002).** Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* 109(3):307-20
- Panda S, Sato TK, Castrucci AM, Rollag MD, DeGrip WJ, Hogenesch JB, Provencio I, Kay SA (2002).** Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science*. 298(5601):2213-2216
- Pandi-Perumal SR, Smits M, Spence W, Srinivasan V, Cardinali DP, Lowe AD, Kayumov L (2007).** Dim light melatonin onset (DLMO): a tool for the analysis of circadian phase in human sleep and chronobiological disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 31(1):1-11
- Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R (2006).** Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J*. 273(13):2813-2838
- Paredes SD, Marchena AM, Bejarano I, Espino J, Barriga C, Rial RV, Reiter RJ, Rodríguez AB (2009).** Melatonin and tryptophan affect the activity-rest rhythm, core and peripheral temperatures, and interleukin levels in the ringdove: changes with age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 64(3):340-350
- Parkes KR (2002).** Shift work and age as interactive predictors of body mass index among offshore workers. *Scand J Work Environ Health*. 28(1):64-71
- Pate RR, Pratt M, Blair SN, Haskell WL, Macera CA, Bouchard C, Buchner D, Ettinger W, Heath GW, King AC (1995).** Physical activity and public health. A recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine. *JAMA*. 273(5):402-407
- Petersen M, Wengel J (2003).** LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends Biotechnol*. 21(2):74-81
- Phillips ML (2009).** Circadian rhythms: Of owls, larks and alarm clocks. *Nature*. 458(7235):142-144
- Pittendrigh CS, Minis DH (1972).** Circadian Systems: Longevity as a Function of Circadian Resonance in *Drosophila melanogaster*. *Proc Nat. Acad Sci U S A*. 69(6):1537-1539
- Pittendrigh CS. (1993).** Temporal organization: Reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu. Rev. Physiol*. 55: 17-54.
- Pronk A, Ji BT, Shu XO, Xue S, Yang G, Li HL, Rothman N, Gao YT, Zheng W, Chow WH (2010).** Night-shift work and breast cancer risk in a cohort of Chinese women. *Am J Epidemiol*. 171(9):953-959
- Quan T, He T, Kang S, Voorhees JJ, Fisher GJ (2002).** Ultraviolet irradiation alters transforming growth factor beta/smad pathway in human skin in vivo. *J Invest Dermatol*. 119(2):499-506
- Rahman SA, Kayumov L, Shapiro CM (2010).** Antidepressant action of melatonin in the treatment of Delayed Sleep Phase Syndrome. *Sleep Med*. 11(2):131-136

- Ralph MR, Menaker M (1988).** A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science*. 241(4870):1225-1227
- Rechtschaffen A, Gilliland MA, Bergmann BM, Winter JB (1983).** Physiological correlates of prolonged sleep deprivation in rats. *Science*. 221(4606):182-184
- Refinetti R, Menaker M (1992)** The circadian rhythm of body temperature. *Physiol Behav*. 51(3):613-637
- Reppert SM, Weaver DR (2001).** Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol*. 63:647-676
- Revel FG, Herwig A, Garidou ML, Dardente H, Menet JS, Masson-Pévet M, Simonneaux V, Saboureau M, Pévet P (2007).** The circadian clock stops ticking during deep hibernation in the European hamster. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 21;104(34):13816-13820
- Richter HG, Torres-Farfán C, Rojas-García PP, Campino C, Torrealba F, Serón-Ferré M (2004).** The circadian timing system: making sense of day/night gene expression. *Biol Res*. 2004;37(1):11-28
- Robilliard DL, Archer SN, Arendt J, Lockley SW, Hack LM, English J, Leger D, Smits MG, Williams A, Skene DJ, Von Schantz M (2002).** The 3111 Clock gene polymorphism is not associated with sleep and circadian rhythmicity in phenotypically characterized human subjects. *J Sleep Res*. 11(4):305-312
- Roche (2003).** *Lexikon Medizin*. 5. bearb. und erw. Auflage München: Urban & Fischer 2086 S.
- Roenneberg T, Kuehnele T, Juda M, Kantermann T, Allebrandt K, Gordijn M, Meroow M (2007).** Epidemiology of the human circadian clock. *Sleep Med Rev*. 11(6):429-438
- Rosenthal NE, Genhart M, Sack DA, Skewerer RG, Wehr TA (1987).** Seasonal affective disorder: relevance for treatment and research of bulimia. In: Hudson EL, PopeHG (EDS:9, *Psychobiology of Bulimia*. American Psychiatric Press, Washington, DC
- Rosenthal NE, Levendosky AA, Skwerer RG, Joseph-Vanderpool JR, Kelly KA, Hardin T, Kasper S, DellaBella P, Wehr TA (1990).** Effects of light treatment on core body temperature in seasonal affective disorder. *Biol Psychiatry*. 27(1):39-50
- Rosenthal NE, Sack DA, Gillin JC, Lewy AJ, Goodwin FK, Davenport Y (1984).** Seasonal affective disorder: a description of the syndrome and preliminary findings with light therapy. *Arch. Gen. Psychiatry* 41: 72-80
- Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, Willett WC, Hunter DJ, Kawachi I, Fuchs CS, Colditz GA (2003).** Night-shift work and risk of colorectal cancer in the nurses' health study. *J Natl Cancer Inst*. 95(11):825-828.
- Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, Willett WC, Hunter DJ, Kawachi I, Colditz GA (2001).** Rotating Night Shifts and Risk of Breast Cancer in Women Participating in the Nurses' Health Study. *J Natl Cancer Inst*. 93(20):1563-1568

- Schmittgen TD, Zakrajsek BA (2000).** Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods.* 46(1-2):69-81
- Shearman LP, Zylka MJ, Weaver DR, Kolakowski LF Jr, Reppert SM (1997).** Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron.* 19(6):1261-1269
- Sherrill DL, Kotchou K, Quan SF (1998).** Association of physical activity and human sleep disorders. *Arch Intern Med.* 158(17):1894-1898
- Shirayama M, Shirayama Y, Iida H, Kato M, Kajimura N, Watanabe T, Sekimoto M, Shirakawa S, Okawa M, Takahashi K (2003).** The psychological aspects of patients with delayed sleep phase syndrome (DSPS). *Sleep Med.* 4(5):427-433
- Shirtcliff EA, Granger DA, Schwartz E, Curran MJ (2001).** Use of salivary biomarkers in biobehavioral research: cotton-based sample collection methods can interfere with salivary immunoassay results. *Psychoneuroendocrinology.* 26(2):165-173
- Silverthorn DU (2009).** *Physiologie.* 4. Auflage. München: Pearson Studium, 1357 S.
- Skene DJ, Bojkowski CJ, Arendt J (1994).** Comparison of the effects of acute fluvoxamine and desipramine administration on melatonin and cortisol production in humans. *Br J Clin Pharmacol.* 37(2):181-186
- Strawbridge WJ, Shema SJ, Roberts RE (2004).** Impact of spouses' sleep problems on partners. *Sleep.* 2004 May 1;27(3):527-315
- Sun ZS, Albrecht U, Zhuchenko O, Bailey J, Eichele G, Lee CC (1997).** RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell.* 90(6):1003-1011
- Takahashi JS (1995).** Molecular neurobiology and genetics of circadian rhythms in mammals. *Annu Rev Neurosci.* 18:531-553
- Takahashi JS, Hamm H, Menaker M (1980).** Circadian rhythms of melatonin release from individual superfused chicken pineal glands in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77(4):2319-2322
- Tanaka H, Taira K, Arakawa M, Urasaki C, Yamamoto Y, Okuma H, Uezu E, Sugita Y, Shirakawa S (2002).** Short naps and exercise improve sleep quality and mental health in the elderly. *Psychiatry Clin Neurosci.* 56(3):233-234
- Teboul M, Barrat-Petit MA, Li XM, Claustrat B, Formento JL, Delaunay F, Lévi F, Milano G (2005).** Atypical patterns of circadian clock gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. *J Mol Med.* 83(9):693-699
- Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, Hirose M, Sakaki Y (1997).** Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature.* 389(6650):512-516
- Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinz WA, Virshup DM, Ptáček LJ, Fu YH (2001).** An

hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science*. 291(5506):1040-1043

Troxel WM, Robles TF, Hall M, Buysse DJ (2007). Marital quality and the marital bed: examining the covariation between relationship quality and sleep. *Sleep Med Rev*. 11(5):389-404

Tyagi S, Kramer FR (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*. 14(3):303-308

Van Cauter E, Leproult R, Plat L (2000). Age-related changes in slow wave sleep and REM sleep and relationship with growth hormone and cortisol levels in healthy men. *JAMA*. 284(7):861-868

van Coevorden A, Mockel J, Laurent E, Kerkhofs M, L'Hermite-Balériaux M, Decoster C, Nève P, Van Cauter E (1991). Neuroendocrine rhythms and sleep in aging men. *Am J Physiol*. 260(4 Pt 1):E651-661

van Someren EJ, Hagebeuk EE, Lijzenga C, Scheltens P, de Rooij SE, Jonker C, Pot AM, Mirmiran M, Swaab DF (1996). Circadian rest-activity rhythm disturbances in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*. 40(4):259-270

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 3(7):RESEARCH0034.1-0034.11

Viswanathan AN, Hankinson SE, Schernhammer ES (2007). Night shift work and the risk of endometrial cancer. *Cancer Res*. 67(21):10618-10622

Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD, Dove WF, Pinto LH, Turek FW, Takahashi JS (1994). Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science*. 264(5159):719-725

Vitiello MV, Smallwood RG, Avery DH, Pascualy RA, Martin DC, Prinz PN (1986). Circadian temperature rhythms in young adult and aged men. *Neurobiol Aging*. 7(2):97-100

Volkov J, Rohan KJ, Yousufi SM, Nguyen MC, Jackson MA, Thrower CM, Postolache TT (2007). Seasonal changes in sleep duration in African American and African college students living in Washington, D.C. *ScientificWorldJournal*. 7:880-887

Voultsios A, Kennaway DJ, Dawson D (1997). Salivary melatonin as a circadian phase marker: validation and comparison to plasma melatonin. *J Biol Rhythms*. 12(5):457-466

Voultsios A, Kennaway DJ, Dawson D (1997). Salivary melatonin as a circadian phase marker: validation and comparison to plasma melatonin. 12(5):457-66

Weitzman ED, Czeisler CA, Coleman RM, Spielman AJ, Zimmerman JC, Dement W, Richardson G, Pollak CP (1981). Delayed sleep phase syndrome. A chronobiological disorder with sleep-onset insomnia. *Arch Gen Psychiatry*. 38(7):737-746

Weitzman ED, Moline ML, Czeisler CA, Zimmerman JC (1982). Chronobiology of aging:

temperature, sleep-wake rhythms and entrainment. *Neurobiol Aging*. 3(4):299-309

Wittchen HU, Krause P, Höfler M, Winter S, Spiegel B, Hajak G, Riemann D, Pittrow D, Steiger A, Pfister H (2001). NISAS-2000 – die „Nationwide Insomnia Screening and Awareness Study“. *Nervenheilkunde* 20: 4-16

Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*. 22(1):130-1, 134-138

Wrosch C, Miller GE, Schulz R (2000). Cortisol secretion and functional disabilities in old age: importance of using adaptive control strategies. *Psychosom Med*. 71(9):996-1003.

Wyatt JK, Ritz-De Cecco A, Czeisler CA, Dijk DJ (1999). Circadian temperature and melatonin rhythms, sleep, and neurobehavioral function in humans living on a 20-h day. *Am J Physiol*. 277(4 Pt 2):R1152-1163

Xu Y, Padiath QS, Shapiro RE, Jones CR, Wu SC, Saigoh N, Saigoh K, Ptáček LJ, Fu YH (2005). Functional consequences of a CK1delta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature*. 434(7033):640-644

Yagita K, Tamanini F, Yasuda M, Hoeijmakers JHJ, van der Horst GTJ, Okamura H (2002). Nucleocytoplasmic shuttling and mCRY-dependent inhibition of ubiquitylation of the mPER2 clock protein. *EMBO Journal* 21 (6): 1301-1314

Yagita K, Yamaguchi S, Tamanini F, van der Horst GTJ, Hoeijmakers JHJ, Yasui A, Loros JJ, Dunlap JC, Okamura H (2000). Dimerization and nuclear entry of mPER proteins in mammalian cells. *Genes and Development* 14 (11): 1353-1363

Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, Siepkha SM, Hong HK, Oh WJ, Yoo OJ, Menaker M, Takahashi JS (2004). Period 2: Luciferase real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(15):5339-5346

Young MW, Kay SA (2001). Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat Rev Genet*. 2(9):702-715

Zailinawati AH, Teng CL, Chung YC, Teow TL, Lee PN, Jagmohani KS (2009). Daytime sleepiness and sleep quality among Malaysian medical students. *Med J Malaysia*. 64(2):108-110

Zanello SB, Jackson DM, Holick MF (2000). Expression of the circadian clock genes clock and period1 in human skin. *J Invest Dermatol*. 115(4):757-760

Zhong H, Simons JW (1999). Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun*. 259(3):523-526

Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR, Reppert SM (1998). Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron*. 20(6):1103-1110

URLs

- 1 www.manufactum.de
(Stand: 20.05.2010, 11:14)
- 2 <http://www.euclock.org/>
(Stand: 02.06.2010, 14:28 Uhr)
- 3 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_012329.1
(Stand: 7.05.2010, 18:47 Uhr)
- 4 http://www.medizin.uni-greifswald.de/neuro_ch/index.php?id=476
(Stand: 08.08. 2010, 20:18 Uhr)
- 5 https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=uplct_020100
(Stand: 10.06.2010, 14:05 Uhr)
- 6 [https://www.roche-applied-science.com/servlet/RCPProductDisplay?storeId=10201&catalogId=10201&langId=-3&countryId=de&forCountryId=de&productId= 3.5 .7.1.1.1](https://www.roche-applied-science.com/servlet/RCPProductDisplay?storeId=10201&catalogId=10201&langId=-3&countryId=de&forCountryId=de&productId=3.5.7.1.1.1)
(Stand: 10.06.2010, 15:29 Uhr)
- 7 https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=uplct_020100
(Stand: 10.06.2010, 16:29 Uhr)
- 8 https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=uplct_020100#ina
(Stand: 11.06.2010, 20:32 Uhr)
- 9 <https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp>
- 10 <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>
(Stand: 06.08. 2010, 12:36 Uhr)

Bedienungsanleitungen

Roche LightCycler® 1.5 Instrument - Operators Manual
Roche LightCycler Operator's Manual Version 3.5 October 2000
Roche LightCycler Software 3.5 Kurzanleitung
Roche Universal ProbeLibrary Probes 1-165 Version Juni 2005
Roche: LightCycler System (second edition)

9 Anhang

A1 Probandeninformation

C A U	Christian-Albrechts-Universität zu Kiel	Mathematisch- Naturwissenschaftliche Fakultät
------------------	---	--

Zoologisches Institut - Abteilung Humanbiologie - Prof. Dr. Manuela Dittmar - Am Botanischen Garten 9 -
24118 Kiel - Tel.: 0431-880-4357

Probandeninformation

Proband(in)-Nr.: DO-.....

Ziel der Untersuchung:

Das Projekt befasst sich mit der „Vergleichenden Untersuchung der inneren Uhr bei jüngeren und älteren Menschen“. Ziel ist herauszufinden, wie sich die innere Uhr des Menschen im Laufe seines Lebens verändert und wie sie sich zwischen verschiedenen Menschen unterscheidet. Mit zunehmendem Alter verschiebt sich der Tagesrhythmus bei vielen Menschen und es treten z.T. Schlafstörungen auf.

Durchführung der Untersuchung:

Am Morgen sammeln Sie in der ersten Stunde nach dem Aufstehen zuhause fünf Speichelproben. Hiermit lässt sich die Konzentration ihres „Weckhormons“ Cortisol bestimmen. Am Nachmittag kommen Sie mit den Speichelproben in die Universität (Abteilung für Humanbiologie). Dort füllen Sie mehrere Fragebögen aus, mit denen Ihre Schlafqualität, Ihr jahreszeitliches Befinden und Ihr Chronotyp (Morgen- oder Abendmensch) bestimmt werden. Anschließend geben Sie mehrere Speichelproben ab. Diese dienen zur Untersuchung sog. Uhrengene, die Ihre innere Uhr mitsteuern. Die Uhrengene werden zu sog. Haushaltsgenen in Bezug gesetzt. Außerdem werden abends maximal zehn Speichelproben im Abstand von einer Stunde im Zeitraum von 17 bis 24 Uhr (ggf. 2 Uhr) gesammelt. Hiermit lässt sich der Spiegel Ihres „Schlafhormons“ Melatonin bestimmen. Außerdem wird Ihre Körpertemperatur, die im Tagesverlauf schwankt, mehrmals mit einem Thermometer gemessen (Mund). Zusätzlich wird Ihr körperlicher Aktivitätsgrad mit einem Fragebogen und einem Akzelerometer (ein Gerät, das Ihre körperliche Aktivität misst und das Sie als Armband tragen) bestimmt.

Die Teilnahme an der Untersuchung ist freiwillig. Ihr Einverständnis können Sie jederzeit auch ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile zu erwarten zurücknehmen. Hinsichtlich des Versicherungsschutzes werden Sie vorsorglich darauf hingewiesen, dass Sie für Gesundheitsschäden oder sonstige Beeinträchtigungen, die Ihnen im Zusammenhang mit der Teilnahme an dieser Untersuchung entstehen, ohne dass ein Mitglied des Forscherteams ein schuldhaftes Fehlverhalten trifft, z.B. für Wegeunfälle, nicht versichert sind.

Datenschutz:

Ihre Daten aus dieser Untersuchung werden vertraulich behandelt und unterliegen den datenschutzrechtlichen Bestimmungen. Ihre Daten werden ausschließlich in der Abteilung für Humanbiologie der Christian-Albrechts-Universität gespeichert. Die Auswertung Ihrer Daten erfolgt anonymisiert (d.h. ohne Namensnennung). Die genetische Analyse der Proben beschränkt sich ausschließlich auf Uhrengene (*hCLOCK*, *hPER1*, *hPER2*, *hPER3*, *hBMAL1*, *hBMAL2*, *hCRY1*, *hCRY2* und *hTIM*), die im Zusammenhang mit biologischen Rhythmen stehen, sowie Haushaltsgenen zum Vergleich (*hCDK4*, *h36B4*, *hGAPDH*, *hPBGD*, *RNA-Polymerase II*, *IBP*, *HPRI*, *β2-microglobulin* und *G6PDH*). Ihre Angaben werden so gespeichert und aufbereitet, dass kein Rückschluss auf Ihre Person möglich ist. Die Daten werden ausschließlich unter wissenschaftlichen Gesichtspunkten ausgewertet. Die Speicherung, Dokumentation, wissenschaftliche Auswertung und ggf. Publikation erfolgen ausschließlich in anonymisierter Form. Alle Personen, die Zugang zu den Proben bzw. Daten haben, sind der Wahrung des Datengeheimnisses verpflichtet. Nach der Auswertung der Ergebnisse werden Ihnen Ihre Befunde auf Wunsch mitgeteilt.

_____ 2008
(Prof. Dr. M. Dittmar) (Datum)

_____ 2008
(Unterschrift Proband) (Datum)

A2 Einverständniserklärung



Zoologisches Institut - Abteilung Humanbiologie - Prof. Dr. Manuela Dittmar - Am Botanischen Garten 9 -
24118 Kiel - Tel.: 0431-880-4357

Einverständniserklärung

Proband(in)-Nr.: DO-.....

zur Studie: „Vergleichenden Untersuchung der inneren Uhr bei jüngeren und älteren Menschen“

Name, Vorname des Probanden _____
 Geburtsdatum: _____
 Adresse: _____
 Telefon-Nr.: _____
 Handy-Nr.: _____
 E-Mail-Adresse: _____

Hiermit erkläre ich mich mit der Teilnahme an der Untersuchung einverstanden.

Ich bin darüber informiert, dass ich jederzeit auch ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile mein Einverständnis zurücknehmen und von der Untersuchung zurücktreten kann.

Ich bin damit einverstanden, dass meine personenbezogenen, für die wissenschaftliche Erforschung notwendigen Daten gesammelt und gespeichert werden. Ich wurde informiert, dass meine Daten ausschließlich in der Abteilung für Humanbiologie der Christian-Albrechts-Universität gespeichert werden. Ich habe Anspruch auf Information über Ziel, Zweck und Verbleib dieser Datensammlung. Die Verarbeitung dieser Daten dient der wissenschaftlichen Forschung.

Alle Personen, die Zugang zu den Daten haben, sind der Wahrung des Datengeheimnisses verpflichtet. Die Speichel- bzw. DNA-Proben werden anonymisiert (d.h. ohne Namensnennung) in den Räumen des Lehrstuhls für Humanbiologie der Christian-Albrechts-Universität gelagert. Alle Personen, die Zugang zu den Daten haben, sind der Wahrung des Datengeheimnisses verpflichtet. Publikationen erfolgen nur anonymisiert. Ich bin damit einverstanden, dass die entnommenen Speichelproben zu wissenschaftlichen, nicht-kommerziellen Untersuchungen verwendet werden und übertrage hiermit für den oben genannten Zweck den Studienleitern das Verfügungsrecht an diesem Material. Die genetische Analyse betrifft ausschließlich die Uhrgene (*hCLOCK*, *hPER1*, *hPER2*, *hPER3*, *hBMAL1*, *hBMAL2*, *hCRY1*, *hCRY2* und *hTIM*) und die Haushaltsgene *hCDK4*, *h30B4*, *hGAPDH*, *hPBGD*, *RNA-Polymerase II*, *TBP*, *HPRT*, β 2-microglobulin und *G6PDH*.

Hinsichtlich des Versicherungsschutzes bin ich vorsorglich darauf hingewiesen worden, dass für Gesundheitsschäden oder sonstige Beeinträchtigungen, die bei mir im Zusammenhang mit der Teilnahme an dieser Untersuchung auftreten, ohne dass den Wissenschaftlern oder ihren Mitarbeitern ein schuldhaftes Fehlverhalten trifft, z. B. auch für Wegeunfälle, nicht versichert bin.

Ich bestätige, dass ich ausführliche Informationen erhalten habe und meine Fragen ausreichend beantwortet wurden. Eine Kopie der Probandeninformation habe ich erhalten. Ich trage keinen Herzschrittmacher. Ich habe zu der Untersuchung keinerlei weitere Fragen und mein Einverständnis bedarf keiner weiteren Bedenkzeit.

 i.A. _____
 (Prof. Dr. M. Dittmar)

 2008
 (Datum)

 (Unterschrift Proband)

 2008
 (Datum)

A3 Allgemeiner Fragebogen

Fragebogen – Allgemeine Daten

Proband/in Nr. DO-.....

Datum:...../...../ 2008

Geschlecht: 1 männlich 2 weiblich

Geburtsdatum: Alter: Jahre

1. Wie ist Ihr **Familienstand**?

1 ledig 2 verheiratet 3 verwitwet 4 geschieden/ getrennt lebend

2. Wie ist Ihre **Wohnsituation**?

1 alleine lebend 2 zusammen lebend

3. Anzahl Kinder:

Alter der Kinder: Jahre

4. Welchen **Beruf** üben Sie momentan aus?

1 Student/in 2 Hausfrau/mann 3 Angestellte/r 4 Arbeiter/in
5 Beamte/r 6 Selbständige/r 7 Ruheständler/in 8 arbeitssuchend

5. Wenn Sie **berufstätig** sind:

ausgeübter Beruf:

Arbeitsumfang: Stunden/Woche

Arbeitszeit: 1 Teilzeit 2 Vollzeit 3 Schichtdienst

Schichtzeit: von bis Uhr

Schichtzeit: von bis Uhr

6. Wie lange halten Sie sich durchschnittlich pro Tag **draußen (wirklich im Freien!) bei Tageslicht** auf?

An Arbeitstagen (Berufstätigkeit): Stunden Minuten

An freien Tagen (keine Berufstätigkeit): Stunden Minuten

7. **Selbsteinschätzung**: waren/sind Sie ein Morgentyp (früh munter) oder ein Abendtyp (spät munter):

	Morgentyp	Mischtyp	Abendtyp
Heute bin ich ein	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>
Im Alter von 20-40 Jahren war ich ein	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>
Als Teenager war ich ein	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>
Als Kleinkind war ich ein	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>

8. Sind Ihre Eltern und Geschwister eher Morgentypen oder Abendtypen:

	Morgentyp	Mischtyp	Abendtyp
Meine Mutter	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>
Mein Vater	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>
Mein erster Bruder	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>
Mein zweiter Bruder	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>
Mein dritter Bruder	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>
Meine erste Schwester	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>
Meine zweite Schwester	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>
Meine dritte Schwester	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>
.....	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>
.....	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>
.....	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>
.....	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>

9. Ihr Partner/ Ihre Partnerin ist ein:

Morgentyp	Mischtyp	Abendtyp
1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>

10. Wie beurteilen Sie Ihren **Gesundheitszustand** im Vergleich zu Ihren Altersgenossen?

1 sehr schlecht 2 schlecht 3 mittel 4 gut 5 sehr gut

11. **Rauchen** Sie?

0 nein 1 ja Zigaretten (Zigarren) /Tag seit Jahren

12. Wie viel **Kaffee/schwarzen Tee/ Mate-Tee/grünen Tee** (mit Koffein/Tein) trinken Sie?

..... Tassen/Woche

13. Wie viel **Alkohol** trinken Sie?

..... Gläser/Woche

14. Welche **Medikamente** nehmen Sie momentan ein? → *bitte Beipackzettel mitbringen*

0 ich nehme kein Medikament ein

1 ich nehme Medikament(e) ein

Name des Medikaments?

Wogegen nehmen Sie das Medikament ein?

.....

.....

.....

.....

.....
.....
.....

15. Nehmen Sie momentan **Schlafmittel** ein?

0 nein 1 ja Name des Schlafmittels? *(bitte notieren)*

.....

16. Wurde eine der folgenden **Krankheiten** bei Ihnen vom Arzt diagnostiziert? *(bitte ankreuzen)*

- | | | |
|---|---------------------------------|-------------------------------|
| Angina pectoris | 0 <input type="checkbox"/> nein | 1 <input type="checkbox"/> ja |
| Koronare Herzkrankheit | 0 <input type="checkbox"/> nein | 1 <input type="checkbox"/> ja |
| Andere Herzerkrankung | 0 <input type="checkbox"/> nein | 1 <input type="checkbox"/> ja |
| Periphere arterielle Verschlusskrankheit ... | 0 <input type="checkbox"/> nein | 1 <input type="checkbox"/> ja |
| Bluthochdruck | 0 <input type="checkbox"/> nein | 1 <input type="checkbox"/> ja |
| Diabetes | 0 <input type="checkbox"/> nein | 1 <input type="checkbox"/> ja |
| Arthrose | 0 <input type="checkbox"/> nein | 1 <input type="checkbox"/> ja |
| Arthritis | 0 <input type="checkbox"/> nein | 1 <input type="checkbox"/> ja |
| Gicht | 0 <input type="checkbox"/> nein | 1 <input type="checkbox"/> ja |
| Krebs | 0 <input type="checkbox"/> nein | 1 <input type="checkbox"/> ja |
| Chronische Lungenerkrankung | 0 <input type="checkbox"/> nein | 1 <input type="checkbox"/> ja |
| Chronisch-obstruktive Lungenkrankheit | 0 <input type="checkbox"/> nein | 1 <input type="checkbox"/> ja |
| Asthma | 0 <input type="checkbox"/> nein | 1 <input type="checkbox"/> ja |
| Bronchitis | 0 <input type="checkbox"/> nein | 1 <input type="checkbox"/> ja |
| Osteoporose | 0 <input type="checkbox"/> nein | 1 <input type="checkbox"/> ja |
| Morbus Cushing (zu viel Cortisol) | 0 <input type="checkbox"/> nein | 1 <input type="checkbox"/> ja |
| Morbus Addison (zu wenig Cortisol) | 0 <input type="checkbox"/> nein | 1 <input type="checkbox"/> ja |
| Chronische Entzündung von Magen
und/oder Speiseröhre | 0 <input type="checkbox"/> nein | 1 <input type="checkbox"/> ja |
| Erkrankungen mit chronischen Schmerzen | 0 <input type="checkbox"/> nein | 1 <input type="checkbox"/> ja |
| Schlafbezogene Atemstörungen | 0 <input type="checkbox"/> nein | 1 <input type="checkbox"/> ja |
| Restless-leg (period. Beinbewegungen) | 0 <input type="checkbox"/> nein | 1 <input type="checkbox"/> ja |

17. Welche weiteren akuten oder chronischen **Krankheiten** haben Sie momentan? *(bitte notieren)*

.....
.....
.....

Für Frauen:

18. Erhalten Sie momentan eine **Hormonersatztherapie**?

0 nein 1 ja

Wenn ja, in welcher Form erhalten Sie diese?

1 Tabletten zur Einnahme 2 Pflaster 3 Lokale Salbe 4 Monatspritze
5 andere Form (*bitte notieren*):

Wenn ja, seit wie vielen Jahren erhalten Sie die Hormonersatztherapie? (*bitte notieren*)

seitJahren

19. Befinden Sie sich in der **Menopause**?

0 nein 1 ja

20. Befinden Sie sich in der **Postmenopause** (Menopause bereits abgeschlossen)?

0 nein 1 ja

21. Nehmen Sie orale **Kontrazeptiva** („Antibabypille“) ein?

0 nein 1 ja

Falls ja, *bitte Präparat notieren*:

Falls nein: Erfolgt Ihr Zyklus regelmäßig? 0 nein 1 ja

22. Vor wie vielen Tagen begann Ihre letzte **Menstruation**? Vor Tagen

A4 Freiburger Fragebogen zur körperlichen Aktivität (Kurzform)

Freiburger Fragebogen zur körperlichen Aktivität- Kurzform

..... Größe:.....cm Gewicht:.....kg
Datum:.....

1) Sind Sie berufstätig (auch Hausfrau) oder in Ausbildung?

- nein ja Ihre berufliche Tätigkeit beinhaltet hauptsächlich:
 sitzende Tätigkeiten (z.B. Büro, Student...)
 mäßige Bewegung (z.B. Handwerker, Hausmeister, Hausfrau...)
 intensive Bewegung (z.B. Postzusteller, Wald- und Bauarbeiter...)

2) Waren Sie in der letzten Woche zu Fuß unterwegs,

- a) ...auf dem Weg zur Arbeit oder zum Einkaufen usw.? nein ja
 Wenn ja, wie lange sind Sie dabei gegangen? **insgesamt**.....Min./Std.
 b) ...zum Spaziergehen? nein ja
 Wenn ja, wie lange waren Sie letzte Woche spazieren? **insgesamt**.....Min./Std.

3) Sind Sie in der letzten Woche Fahrrad gefahren,

- a) ...zur Arbeit oder zum Einkaufen usw.? nein ja
 Wenn ja, wie lange sind Sie dabei geradelt? **insgesamt**.....Min./Std.
 b) ...auf dem Heimtrainer bzw. auf Radtouren? nein ja
 Wenn ja, wie lange sind Sie dabei geradelt? **insgesamt**.....Min./Std.

- 4) Haben Sie einen Garten?** nein ja Wenn ja,
 wie viel **Stunden** haben Sie **letzte Woche** in Ihrem Garten verbracht?Std. pro Woche
 Davon warenStd Gartenarbeit
 undStd Ruhe und Erholung

- 5) Steigen Sie regelmäßig Treppen?** nein
 ja,Stockwerke, mal am Tag

- 6) Sind Sie im letzten Monat geschwommen?** nein
 ja, ca.Std. im Monat (reine Schwimmzeit)

7) Haben Sie im letzten Monat Sport betrieben?
 (z.B. Jogging, Fußball, Handball, Federball, Squash, Gymnastik, Tennis, Tischtennis.....)

- nein
 ja, wenn ja, welchen Sport
 1 ca Min./Std. pro Woche/ Monat
 2 ca Min./Std. pro Woche/ Monat
 3 ca Min./Std. pro Woche/ Monat
 4 ca Min./Std. pro Woche/ Monat

8) Gehen Sie zu Tanzveranstaltungen und/ oder kegeln Sie?

- Tanzen: nein ja mal/ Monat je:Stunden
 Kegeln: nein ja mal/ Monat je:Stunden

Vielen Dank

A5 Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI)-Fragebogen zur Bestimmung der Schlafqualität

Schlafqualitäts-Fragebogen (PSQI)

Proband-Nr.: DO -.....

Datum:/..... 2008

Die folgenden Fragen beziehen sich auf Ihre üblichen Schlafgewohnheiten und zwar *nur während der letzten vier Wochen*. Ihre Antworten sollten möglichst genau sein und sich auf die Mehrzahl der Tage und Nächte während der letzten vier Wochen beziehen. Beantworten Sie bitte alle Fragen.

1. Wann sind Sie während der letzten vier Wochen gewöhnlich abends zu Bett gegangen?

2. Wie lange hat es während der letzten vier Wochen gewöhnlich gedauert, bis Sie nachts eingeschlafen sind?

in Minuten:

3. Wann sind Sie während der letzten vier Wochen gewöhnlich morgens aufgestanden?

übliche Uhrzeit:

4. Wie viele Stunden haben Sie während der letzten vier Wochen pro Nacht tatsächlich geschlafen?

(Das muss nicht mit der Anzahl der Stunden, die Sie im Bett verbracht haben, übereinstimmen.)

Effektive Schlafzeit (Stunden) pro Nacht:

Kreuzen Sie bitte für jede der folgenden Fragen die für Sie zutreffende Antwort an. Beantworten Sie bitte alle Fragen.

5. Wie oft haben Sie während der letzten vier Wochen schlecht geschlafen, ...

a) ... weil Sie nicht innerhalb von 30 Minuten einschlafen konnten?

- Während der letzten vier Wochen gar nicht
- Weniger als einmal pro Woche
- Einmal oder zweimal pro Woche
- Dreimal oder häufiger pro Woche

b) ... weil Sie mitten in der Nacht oder früh morgens aufgewacht sind?

- Während der letzten vier Wochen gar nicht
- Weniger als einmal pro Woche
- Einmal oder zweimal pro Woche
- Dreimal oder häufiger pro Woche

c) ... weil Sie aufstehen mussten, um zur Toilette zu gehen?

	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"><ul style="list-style-type: none"><input type="radio"/> Während der letzten vier Wochen gar nicht<input type="radio"/> Weniger als einmal pro Woche<input type="radio"/> Einmal oder zweimal pro Woche<input type="radio"/> Dreimal oder häufiger pro Woche</div>
d) ... weil Sie Beschwerden beim Atmen hatten?	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"><ul style="list-style-type: none"><input type="radio"/> Während der letzten vier Wochen gar nicht<input type="radio"/> Weniger als einmal pro Woche<input type="radio"/> Einmal oder zweimal pro Woche<input type="radio"/> Dreimal oder häufiger pro Woche</div>
e) ... weil Sie husten mussten oder laut geschnarcht haben?	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"><ul style="list-style-type: none"><input type="radio"/> Während der letzten vier Wochen gar nicht<input type="radio"/> Weniger als einmal pro Woche<input type="radio"/> Einmal oder zweimal pro Woche<input type="radio"/> Dreimal oder häufiger pro Woche</div>
f) ... weil Ihnen zu kalt war?	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"><ul style="list-style-type: none"><input type="radio"/> Während der letzten vier Wochen gar nicht<input type="radio"/> Weniger als einmal pro Woche<input type="radio"/> Einmal oder zweimal pro Woche<input type="radio"/> Dreimal oder häufiger pro Woche</div>
g) ... weil Ihnen zu warm war?	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"><ul style="list-style-type: none"><input type="radio"/> Während der letzten vier Wochen gar nicht<input type="radio"/> Weniger als einmal pro Woche<input type="radio"/> Einmal oder zweimal pro Woche<input type="radio"/> Dreimal oder häufiger pro Woche</div>
h) ... weil Sie schlecht geträumt hatten?	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"><ul style="list-style-type: none"><input type="radio"/> Während der letzten vier Wochen gar nicht<input type="radio"/> Weniger als einmal pro Woche<input type="radio"/> Einmal oder zweimal pro Woche<input type="radio"/> Dreimal oder häufiger pro Woche</div>
i) ... weil Sie Schmerzen hatten?	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"><ul style="list-style-type: none"><input type="radio"/> Während der letzten vier Wochen gar nicht<input type="radio"/> Weniger als einmal pro Woche<input type="radio"/> Einmal oder zweimal pro Woche<input type="radio"/> Dreimal oder häufiger pro Woche</div>
j) ... aus anderen Gründen?	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"><p>Und wie oft während des letzten Monats konnten Sie aus diesem Grund schlecht schlafen?</p><ul style="list-style-type: none"><input type="radio"/> Während der letzten vier Wochen gar nicht<input type="radio"/> Weniger als einmal pro Woche<input type="radio"/> Einmal oder zweimal pro Woche<input type="radio"/> Dreimal oder häufiger pro Woche</div>
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; min-height: 60px;"><p>Bitte beschreiben:</p></div>	

6. Wie würden Sie insgesamt die Qualität Ihres Schlafes während der letzten vier Wochen beurteilen?

- Sehr gut
- Ziemlich gut
- Ziemlich schlecht
- Sehr schlecht

7. Wie oft haben Sie während der letzten vier Wochen Schlafmittel eingenommen (vom Arzt verschriebene oder frei verkäufliche)?

- Während der letzten vier Wochen gar nicht
- Weniger als einmal pro Woche
- Einmal oder zweimal pro Woche
- Dreimal oder häufiger pro Woche

8. Wie oft hatten Sie während der letzten vier Wochen Schwierigkeiten wach zu bleiben, etwa beim Autofahren, beim Essen oder bei gesellschaftlichen Anlässen?

- Während der letzten vier Wochen gar nicht
- Weniger als einmal pro Woche
- Einmal oder zweimal pro Woche
- Dreimal oder häufiger pro Woche

9. Hatten Sie während der letzten vier Wochen Probleme, mit genügend Schwung die üblichen Alltagsaufgaben zu erledigen?

- Keine Probleme
- Kaum Probleme
- Etwas Probleme
- Große Probleme

10. Schlafen Sie allein in Ihrem Zimmer?

- Ja
- Ja, aber ein Partner/Mitbewohner schläft in einem anderen Zimmer
- Nein, der Partner schläft im selben Zimmer, aber nicht im selben Bett
- Nein, der Partner schläft im selben Bett

Falls Sie einen Mitbewohner / Partner haben, fragen Sie sie/ihn bitte, ob und wie oft er/sie bei Ihnen folgendes bemerkt hat.

a) Lautes Schnarchen

- Während der letzten vier Wochen gar nicht
- Weniger als einmal pro Woche
- Einmal oder zweimal pro Woche
- Dreimal oder häufiger pro Woche

b) Lange Atempausen während des Schlafes

- Während der letzten vier Wochen gar nicht
- Weniger als einmal pro Woche
- Einmal oder zweimal pro Woche
- Dreimal oder häufiger pro Woche

c) Zucken oder ruckartige Bewegungen der Beine während des Schlafes

- Während der letzten vier Wochen gar nicht
- Weniger als einmal pro Woche
- Einmal oder zweimal pro Woche
- Dreimal oder häufiger pro Woche

d) Nächtliche Phasen von Verwirrung oder Desorientierung während des Schlafes

- Während der letzten vier Wochen gar nicht
- Weniger als einmal pro Woche
- Einmal oder zweimal pro Woche
- Dreimal oder häufiger pro Woche

e) Oder andere Formen von Unruhe während des Schlafes

Bitte beschreiben:

Machen Sie bitte noch folgende Angaben zu Ihrer Person:

Alter: _____ Jahre

Geschlecht: weiblich
 männlich

A6 Epworth Sleepiness Scale (ESS)-Fragebogen zur Bestimmung der Tagesschläfrigkeit

ESS-FRAGEBOGEN

Proband(in)-Nr.: DO-.....

Datum:/..... 2008

Die fett gedruckte Frage bezieht sich auf Ihr normales Alltagsleben in der letzten Zeit:
Für wie wahrscheinlich halten Sie es, dass Sie in einer der folgenden Situationen einnicken oder einschlafen würden, - sich also nicht nur müde fühlen? Auch wenn Sie in der letzten Zeit einige dieser Situationen nicht erlebt haben, versuchen Sie sich trotzdem vorzustellen, wie sich diese Situationen auf Sie ausgewirkt hätten.

Benutzen Sie bitte die folgende Skala, um für jede Situation eine möglichst genaue Einschätzung vorzunehmen und kreuzen Sie die entsprechende Zahl an:

- 0 = würde *niemals* einnicken
- 1 = *geringe* Wahrscheinlichkeit einzunicken
- 2 = *mittlere* Wahrscheinlichkeit einzunicken
- 3 = *hohe* Wahrscheinlichkeit einzunicken

Bitte kreuzen Sie eine Möglichkeit an:

Situation	Wahrscheinlichkeit einzunicken
Im Sitzen lesend	① ① ② ③
Beim Fernsehen	① ① ② ③
Wenn Sie passiv (als Zuhörer) in der Öffentlichkeit sitzen (z.B. im Theater oder bei einem Vortrag)	① ① ② ③
Als Beifahrer im Auto während einer einstündigen Fahrt ohne Pause	① ① ② ③
Wenn Sie sich am Nachmittag hingelegt haben, um auszuruhen	① ① ② ③
Wenn Sie sitzen und sich mit jemand unterhalten	① ① ② ③
Wenn Sie nach dem Mittagessen (ohne Alkohol) ruhig dasitzen	① ① ② ③
Wenn Sie als Fahrer eines Autos verkehrsbedingt einige Minuten halten müssen	① ① ② ③
Summe	

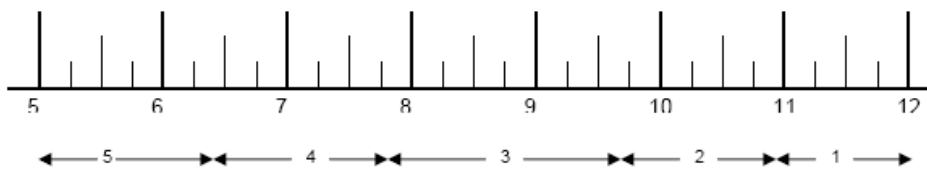
A7 Deutsche Version des Morningness-Eveningness-Questionnaire (D-MEQ) zur Bestimmung des Chronotyps

Chronotyp - Horne-Östberg-Fragebogen
(dt. validierte Version von Griefahn, D-MEQ)

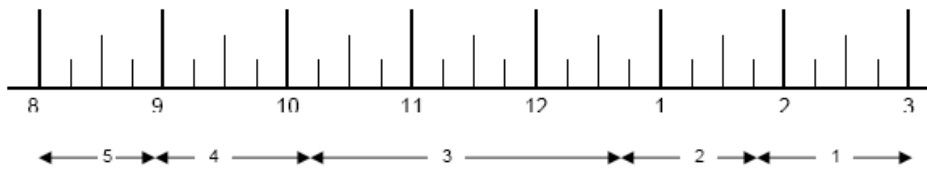
Proband-Nr.: DO -.....
Datum:/..... 2008

1. Bitte lesen Sie jede Frage sorgfältig durch, bevor Sie antworten.
2. Beantworten Sie bitte alle Fragen, auch dann wenn Sie sich bei einer Frage unsicher sind.
3. Beantworten Sie die Fragen in der vorgegebenen Reihenfolge.
4. Beantworten Sie die Fragen so schnell wie möglich. Es sind die ersten Reaktionen auf die Fragen, die uns mehr interessieren als eine lange überlegte Antwort.
5. Beantworten Sie jede Frage ehrlich. Es gibt keine richtige oder falsche Antwort.

1. Wenn es nur nach Ihrem eigenen Wohlbefinden ginge und Sie Ihren Tag völlig frei einteilen könnten, wann würden Sie dann aufstehen?



2. Wenn es nur nach Ihrem eigenen Wohlbefinden ginge und Sie Ihren Abend völlig frei gestalten könnten, wann würden Sie dann zu Bett gehen?



3. Wie sehr sind Sie von Ihrem Wecker abhängig, wenn Sie morgens zu einer bestimmten Zeit aufstehen müssen?

Überhaupt nicht abhängig	4
Etwas abhängig	3
Ziemlich abhängig	2
Sehr abhängig	1

4. Wie leicht fällt es Ihnen üblicherweise morgens aufzustehen?

Überhaupt nicht leicht	1
Nicht sehr leicht	2
Ziemlich leicht	3
Sehr leicht	4

5. Wie wach fühlen Sie sich morgens in der ersten halben Stunde nach dem Aufwachen?

Überhaupt nicht wach	1
Ein bisschen wach	2
Ziemlich wach	3
Sehr wach	4

6. Wie ist Ihr Appetit in der ersten halben Stunde nach dem Aufwachen?

Sehr gering	1
Ziemlich gering	2
Ziemlich gut	3
Sehr gut	4

7. Wie müde fühlen Sie sich morgens in der ersten halben Stunde nach dem Aufwachen?

Sehr müde	1
Ziemlich müde	2
Ziemlich frisch	3
Sehr frisch	4

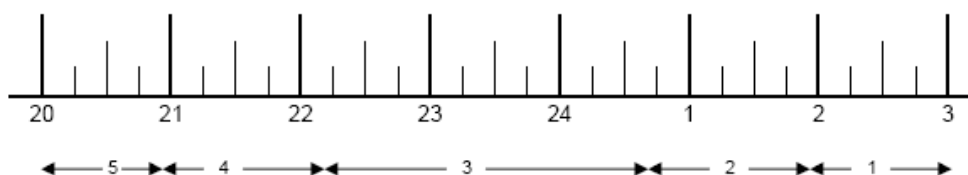
8. Wenn Sie am folgenden Tag keinerlei Verpflichtungen haben, wann gehen Sie dann – verglichen mit Ihrer üblichen Schlafenszeit – zu Bett?

Selten oder nie später	4
Weniger als eine Stunde später	3
1-2 Stunden später	2
Mehr als 2 Stunden später	1

9. Sie haben beschlossen, sich körperlich zu betätigen. Ein Freund rät Ihnen, zweimal wöchentlich eine Stunde zu trainieren; für ihn sei die beste Zeit zwischen 7 und 8 Uhr. Ausgehend von Ihrem eigenen Wohlbefinden, wie schätzen Sie Ihre Leistungsfähigkeit zu dieser Zeit ein?

Ich wäre gut in Form	4
Ich wäre ziemlich in Form	3
Es wäre ziemlich schwierig für mich	2
Es wäre sehr schwierig für mich	1

10. Um wie viel Uhr werden Sie abends müde und haben das Bedürfnis schlafen zu gehen?



11. Sie möchten für einen zweistündigen Test, von dem Sie wissen, dass er mental sehr beansprucht, in Bestform sein. Wenn es nur nach Ihrem eigenen Wohlbefinden ginge und wenn Sie Ihren Tag völlig frei einteilen könnten, welchen der vier Test-Zeiträume würden Sie wählen?

8-10 Uhr	6
11-13 Uhr	4
15-17 Uhr	2
19-21 Uhr	0

12. Wenn Sie um 23 Uhr zu Bett gehen sollten, wie müde wären Sie dann?

Überhaupt nicht müde	0
Etwas müde	2
Ziemlich müde	3
Sehr müde	5

13. Aus irgendeinem Grund sind Sie einige Stunden später als gewöhnlich zu Bett gegangen. Es besteht jedoch keine Notwendigkeit, am nächsten Morgen zu einer bestimmten Uhrzeit aufzustehen. Welcher der folgenden Fälle wird bei Ihnen am ehesten eintreten?

Ich werde zur üblichen Uhrzeit wach und schlafe nicht wieder ein	4
Ich werde zur üblichen Uhrzeit wach, döse danach noch ein wenig	3
Ich werde zur üblichen Uhrzeit wach, schlafe aber wieder ein	2
Ich wache erst später als üblich auf	1

14. In einer Nacht müssen Sie für eine Nachtwache zwischen 4 und 6 Uhr wach sein. Am darauf folgenden Tag haben Sie keine weiteren Verpflichtungen. Welche der nachfolgenden Alternativen sagt Ihnen am ehesten zu?

Ich werde erst nach der Nachtwache zu Bett gehen	1
Ich werde vorher ein Nickerchen machen und nach der Nachtwache schlafen	2
Ich werde vorher richtig schlafen und hinterher noch ein Nickerchen machen	3
Ich werde nur vorher schlafen	4

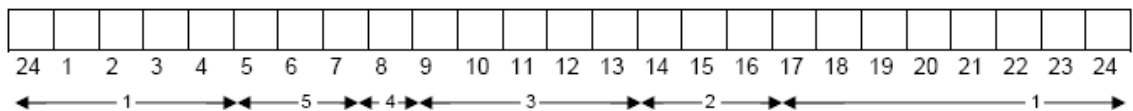
15. Sie müssen zwei Stunden körperlich hart arbeiten und können sich Ihren Tag völlig frei einteilen. Wenn es nur nach Ihrem eigenen Wohlbefinden ginge, welche der folgenden Zeiten würden Sie wählen?

8-10 Uhr	4
11-13 Uhr	3
15-17 Uhr	2
19-21 Uhr	1

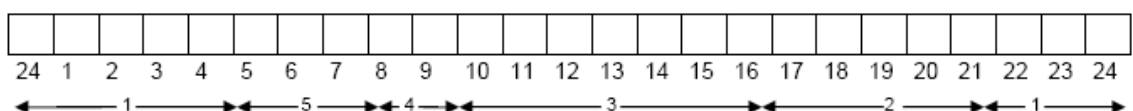
16. Sie haben sich zu einem anstrengenden körperlichen Training entschlossen. Ein Freund rät Ihnen, zweimal wöchentlich eine Stunde zu trainieren; für ihn sei die beste Zeit zwischen 22 und 23 Uhr. Ausgehend von Ihrem eigenen Wohlbefinden, wie schätzen Sie Ihre Leistungsfähigkeit zu dieser Zeit ein?

Ich wäre gut in Form	1
Ich wäre ziemlich in Form	2
Es wäre ziemlich schwierig für mich	3
Es wäre sehr schwierig für mich	4

17. Angenommen, Sie könnten Ihre Arbeitszeit frei wählen und Ihre Arbeitszeit beträgt 5 Stunden pro Tag (einschließlich der Pausen), die Tätigkeit ist interessant und wird nach Erfolg bezahlt. Welche 5 aufeinander folgenden Stunden würden Sie wählen?



18. Zu welcher Tageszeit fühlen Sie sich Ihrer Meinung nach am besten?



19. Man spricht bei Menschen von „Morgen-“, und „Abendtypen“. Zu welchem der folgenden Typen zählen Sie sich?

Eindeutig „Morgentyp“	6
Eher „Morgen-“ als „Abendtyp“	4
Eher „Abend-“ als „Morgentyp“	2
Eindeutig Abendtyp	0

Alter: Jahre

Geschlecht: 1 männlich 2 weiblich

A8 Seasonal Pattern Assessment Questionnaire (SPAQ) zur Bestimmung der Saisonalität

Seasonal Pattern assessment Questionnaire (SPAQ)
 [Rosenthal et al. 1984; dt. Version: Kasper 1991; verändert n. Kasper]

Proband-Nr.: DO-.....
 Datum:/..... 2008

1 Sind Sie
 1 beschäftigt / Student
 2 arbeitssuchend
 3 Hausfrau /-mann
 4 im Ruhestand

2 Stellt der Wechsel der Jahreszeiten für Sie ein Problem dar?
 1 ja, gering 0 nein
 2 ja, mäßig
 3 ja, deutlich
 4 ja, schwer
 5 ja, invalidisierend

3 Seit wie vielen Jahren leben Sie in dieser klimatischen Zone (Mitteleuropa)? Seit _____ Jahren

4 In welchem Ausmaß verändern sich die folgenden Bereiche bei Ihnen persönlich mit den Jahreszeiten? (Bitte nur einen Kreis pro Zeile ankreuzen)

	Keine Veränderung	Geringe Veränderung	Mäßige Veränderung	Deutlich ausgeprägte Veränderung	Extrem ausgeprägte Veränderung
	1	2	3	4	5
4.1 Schlafdauer	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4.2 Soziale Aktivität	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4.3 Stimmung (Allg. Wohlbefinden)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4.4 Gewicht	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4.5 Appetit	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4.6 Energie	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

5

Bei den folgenden Fragen sind Mehrfachnennungen möglich. Kreuzen Sie also bitte alle zutreffenden Monate an.

Wann...	Jan 1	Feb 2	März 3	April 4	Mai 5	Juni 6	Juli 7	Aug 8	Sept 9	Okt 10	Nov 11	Dez 12	Kein bestimmter Zeitraum ragt heraus 13
5.1 fühlen Sie sich am besten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5.2 nehmen Sie an Gewicht zu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5.3 haben Sie die meisten sozialen Kontakte	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5.4 schlafen Sie am meisten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5.5 essen Sie am meisten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5.6 nehmen Sie an Gewicht ab	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5.7 haben Sie am wenigsten soziale Kontakte	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5.8 Fühlen Sie sich am schlechtesten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5.9 Essen Sie am wenigsten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5.10 Schlafen Sie am wenigsten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

6

Bitte benutzen Sie die unterhalb aufgeführte Skala und geben Sie an, wie Sie sich bei den verschiedenen Wetterbedingungen fühlen (NUR EINE ANTWORT MÖGLICH)

-3	=	sehr schlecht oder ausgeprägt verlangsamt
-2	=	mäßig schlecht/ verlangsamt
-1	=	geringgradig schlecht/ verlangsamt
0	=	kein Effekt
+1	=	Stimmung oder Energie ist geringgradig verbessert
+2	=	Stimmung oder Energie ist mäßig verbessert
+3	=	Stimmung oder Energie ist deutlich verbessert

	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	Weiß ich nicht
6.1 Kaltes Wetter	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
6.2 Heißes Wetter	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
6.3 Feuchtes Wetter	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
6.4 Sonnige Tage	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
6.5 Trockene Tage	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
6.6 Graue, wolkenverhangene Tage	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
6.7 Lange Tage	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
6.8 Hoher Pollengehalt	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
6.9 Tage mit Nebel oder Smog	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
6.10 Kurze Tage	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

ODER

7

Wieviel schwankt Ihr Körpergewicht im Laufe des Jahres?

- 1 0-2 kg
- 2 2-3 kg
- 3 4- 5 kg
- 4 6-7 kg
- 5 8-10 kg
- 6 Über 10 kg

<p>8 Wieviele Stunden schlafen Sie (ungefähr) in einer 24 Stunden Zeitspanne in der angegebenen Jahreszeit (einschließlich Nickerchen)?</p> <p>Stunden:</p>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	Mehr als 18h	
	Winter (21. Dez – 20. März)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
	Frühjahr (21. März – 20. Jun)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
	Sommer (21. Jun – 20. Sep)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
	Herbst (21. Sep – 20. Dez)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

9 Haben Sie in der Auswahl der Nahrungsmittel jahreszeitliche Unterschiede bemerkt?

0 nein
 1 ja (bitte näher beschreiben): _____

10 Stellen die Veränderungen, die die verschiedenen Jahreszeiten mit sich bringen ein Problem für Sie dar?

0 nein
 1 ja
 Wenn ja: Ist dieses Problem

gering	mäßig	deutlich	schwer	invalidisierend
1 <input type="radio"/>	2 <input type="radio"/>	3 <input type="radio"/>	4 <input type="radio"/>	5 <input type="radio"/>

Vielen Dank für Ihre Teilnahme!

Denise Olbrich

A9 Genarbeitsblatt *hBmal1*

Vollständiger Name des Gens	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like</i>
Vorwärtsprimer:	5'- caggaaaaataggccgaatg -3'
Rückwärtsprimer:	5'- gcgatgaccctcttatcctg -3'
Amplikonlänge:	66bp
Verwendete Sonde:	Nr. 73

Sequenz:

D89722.1|D89722:EMBL|9786136:GDB|HIT000102049:H-InvDB Homo sapiens mRNA for BMAL1a, complete cds.

gccccaccgacctgctttccagctctcttgggtaccagtggtgtggattgcaaccgcaaac
ggaaaggcagctccactgactaccattcacaggtcgaatttggggagcacaatggctgga
ggtcagatgccactaggagatgctatgattaatatagaaagcatggacacagacaaaga
tgacctcatggaaggtagaatatacagaacaccaaggaaggataaaaaatgcaaggga
agctcacagtcagattgaaaagcggcgtcgggataaaaatgaacagttttatagatgaatt
ggcttcttgggtaccaacatgcaacgcaatgtccaggaaattagataaaacttactgtgct
aaggatggctgttcagcacatgaaaacattaagaggtgccaccaatccatacacagaagc
aaactacaaaccaacttttctatcagacgatgaattgaaacacctcattctcagggcagc
agatggatttttgtttgctgtaggatgtgaccgaggaagatactctttgtctcagagtc
tgtcttcaagatcctcaactacagccagaatgatctgattgggtcagagtttgtttgacta
cctgcatcctaaagatattgcaaagtcaaggagcagctctcctcctctgacaccgcacc
ccgggagcggctcatagatgcaaaaactggacttccagttaaaacagatataaccctgg
gccatctcgattatgttctggagcacgacgttcttctctctgtaggatgaagtgtaacag
gccttcagtaaagggtgaagacaaggacttccctctacctgctcaaagaaaaagcaga
tcgaaaaagcttctgcacaatccacagcacaggctatgtgaaaagctggccaccacaaa
gatggggctggatgaagacaacgaaccagacaatgaggggtgtaacctcagctgcctcgt
cgcaattggacgactgcattctcatgtagttccacaaccagtgaaacggggaatcagggg
gaaatctatggaatatgtttctcggcagcgcgatagatggcaagtttgtttttgtagacca
gagggcaacagctattttggcatatttaccacaagaacttctaggcacatcgtgttatga
atattttaccaagatgacataggacatcttgcagaatgtcataggcaagttttacagac
gagagaaaaaattacaactaattgctataaaatttaaaatcaaagatggttcttttatcac
actacggagtcgatgggttcagtttcatgaacccttggaccaaggaagtagaatatattgt
ctcaactaacactgttgttttagccaacgtcctggaaggcggggacccaaccttcccaca
gctcacagcatccccccacagcatggacagcatgctgccctctggagaagggtggccaaa
gaggaccaccccactgttccagggattccagggggaacccgggctgggg**caggaaaaat**
aggccgaatgatttgctgaggaaatcatggaaatcca**caggataagaggggtcatcgc**cttc
tagctgtggctccagccattgaaatcacgagtagcctccccctgatgcctcttctcc
aggaggcaagaagattttaaatggagggactccagacattccttccagtggcctactatc
aggccaggctcaggagaaccagggttatccatattctgatagttcttctattcttgggtga
gaacccccacataggtatagacatgattgacaacgaccaaggatcaagtagtcccagtaa
tgatgaggcagcaatggctgtcatcatgagcctcttggaaagcagatgctggactgggtgg
ccctgttgacttttagtgacttgccatggcgcgtgtaaactacatgttgctttggcaac
agctatagtatcaaagtgcaactactggtggagttttacagctctgtgaagcttactggata

Anhang

aggagagaatagcttttatgtactgacttcataaaagccatctcagagccattgatacaa
gtcaatcttactatatgtaacttcagacaaaagtggaaactaagcctgctccagtgttcct
catcattgattattgggccagctgtggatagcttgcattaattgtatattttggattctg
tttgtgttgaattttttaatcattgtgacagaagcatcattggtagcttttatatgcaa
atggtcatttcagatgtatgggtgtttttacactacaaagaagtccccatgtggatattt
cttataactaattgtatcataaagccgtttattcttccttgtaagaatcctttactataaa
tatgggttaaagtataatgtactagacagttaaatatttttaataaatgtttcccttggt
ctattaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaacggc

A10 Genarbeitsblatt *hPer1*

Vollständiger Name des Gens	<i>Humanes Period Homolog 1</i>
Vorwärtsprimer:	5'- atgggtccactgctccatc -3'
Rückwärtsprimer:	5'- cggtcaggacctcctctg -3'
Amplikonlänge:	121 bp
Verwendete Sonde:	Nr 62

Sequenz:

BC028207.1|BC028207:EMBL|HIT000040486:H-
InvDB|IMAGp998H1711541:RZPD|IRAKp961H0462:RZPD Homo sapiens period
homolog 1 (Drosophila), mRNA (cDNA clone IMAGE:521552), complete cds.

```

gtgcgcgccgagcgggtactggctgtgatcgaacttctcaaccctcagagacttagatcct
ccacctcactccctcagccaagcctccaggccccctcgtgcatccggtggcctctctg
ccttctctgttctgttctccccatggcccagacatgagtggccccctagaaggggctgat
gggggaggggaccccaggcctggggaatcattttgtcctgggggctcccatcccctggg
ccccacagcaccggccttgcccaggccccagcctggccgatgacaccgatgccaacagc
aatggttcaagtggcaatgagtccaacgggcatgagtctagaggcgcattctcagcggagc
tcacacagctcctcctcaggcaacggcaaggactcagccctgctggagaccactgagagc
agcaagagcacaactctcagagcccatccccaccagcagttccattgcctacagcctc
ctgagtgccagctcagagcaggacaaccctccaccagtggctgcagcagtgaacagtca
gcccgggcaaggactcagaaggaactcatgacagcacttcgagagctcaagcttcgactg
ccgccagagcgcgggggcaaggccgctctgggacctggccacgctgcagtaacgactg
gcctgtgtcaagcaggtgcaggccaaccaggaatactaccagcagtgaggcctggaggag
ggcgagccttgcctcatggacatgtccacctataccctggaggagctggagcacatcacg
tctgagtacacacttcagaaccaggataccttctcagtggctgtctccttctgacgggc
cgaatcgtctacatttcggagcaggcagcctcctgctgcgttgcaagcgggacgtgttc
cggggtaccgcttctctgagctcctggctccccaggatgtgggagcttctatgggtcc
actgctccatctcgctgccacctggggcacaggggctcagcaggttcaggcctcagg
gactttaccagggagaagtccgtcttctgcccgtatcagaggaggtcctgaccgggatcca
gggctcgggtaccagccattccgcctaaccctcgatgtgaccaagatccgggtctcagat
ggggccccctgcacagccgtgctgctgctgattgcagagcgcattcattcgggttacgaa
gctccccggataccccctgacaagaggattttactacgcggcacacaccagctgcctc
ttccaggatgtggatgaaagggctgccccctgctgggctacctgccccaggacctcctg
ggggccccagtgctcctgttctctgcatcctgaggaccgaccctcatgctggctatccac
aagaagattctgcagttggcgggcccagccctttgaccactcccctatccgcttctgtgcc
cgcaacggggagtagtgcaccatggacaccagctgggctggctttgtgcaccctgggagc
cgcaaggtagccttcgtgttgggcccacaaagtacgcacggccccctgaatgaggac
gtgttccactccccggccccagcccagctccctccctggacactgatatccaggagctg
tcagagcagatccaccggctgctgctgcagcccgtccacagccccagccccagggactc
tgtggagtcggcgccgtgacatccccaggccctctccacagccctgggtcctccagtgat
agcaacggggggtgatgcagaggggctgggctcctgctgcactacaggcacgttcaagg
ccaaggcccttccctgccaatccccagaccagagctggaggcgggttctgctcccgtcc

```


Anhang

aggccccactagccttggtcacctgaggaggccgagaggaaagaagcctccagctgctcct
accagcagatcaactgcctggacagcatcctcaggtacctggagagctgcaacctccca
gcaccactaagcgtaaatgtgcctcctcctcctcctataaccacctcctcagcctctgacg
acgacaggcagaggacaggtccagtctctgtggggaccaagaaagacatcatcatgatgg
aggacctgcctggcttagccccaggccagccccagccccagccccagccccacagtag
cccctgacctagccccagacgcctaccgtccagtggggctgaccaaggccgtgctgtccc
tgcacacgcagaaggaagagcaagcctcctcagccgcttccgagacctgggcaggctgc
gtggactcgacagctcttccacagctccctcagccctggcgagcgaggtagccacctgg
ggcctcctggagcctgcctcctgcccagtctaggactggattgttgggggggtgggtctta
agggaggtgtttctgctccagggacctcaggtggtgttgccttccaccactaggccctgcc
tagggacaggccccctcgctagcttctccccactaggatgggggttccgggctgcagccaga
ggagggcagcctggggggatggcactgggatgggcaggcagaggtgctgtctccaggtaa
gcgacttcaggcctagcctggggggcaggggcaggaagtatgccacttaggagtcagttg
tcactgatgaagagacatgcatagattctggggccaactctgggtgggggtctgggcttcaa
gggcaggtggaaggcagccccctccaggtgcctgagggagatccccctgcaggcagacgcag
gactcaggactgggcttccagccccactcttccactccattgcaagctaggcagaatacg
gcctcgatgggcaggaggaatgcctaggctggcagtgccccacaggagtttggcggaccag
agccatctgtccatgtgtccatggactcacctgcttccctccatctgccagcatgcctcc
atcttccgcacacccccagctcgacctctgtgtaacctctccctggccttgttcccttc
tcaataaatccccttgtccctggaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

A11 Genarbeitsblatt h36B4

Vollständiger Name des Gens	<i>Human acidic ribosomal phosphoprotein P0</i>
Vorwärtsprimer:	5'- ctacaaccctgaagtgcttga -3'
Rückwärtsprimer:	5'- caatctgcagacagacactgg -3'
Amplikonlänge:	96 bp
Verwendete Sonde:	Nr. 6

Verwendete Sequenz:

M17885.1|M17885:EMBL|1222484:GDB|678399:GDB|HIT000194603:H-InvDB Human acidic ribosomal phosphoprotein P0 mRNA, complete cds

```

cttctctcgccaggcgtcctcgtggaagtgacatcgtctttaaacccctcgtggcaatc
cctgacgcaccgccgtgatgccaggaagacagggcgacctggaagtcactacttcc
ttaagatcatccaactattggatgattatccgaaatgtttcattgtgggagcagacaatg
tgggctccaagcagatgcagcagatccgcatgtcccttcgcggggaaggctgtggtgctga
tgggcaagaacacccatgatgcgcaaggccatccgagggcacctggaaaacaaccagctc
tggagaaactgctgcctcatatccgggggaatgtgggctttgtgttcaccaaggaggacc
tcactgagatcagggacatggtgctggccaataagggtgccagctgctgccctgctggtg
ccattgccccatgtgaagtcactgtgccagccagaacactggtctcgggcccgagaaga
cctcctttttccaggctttaggatcaccactaaaatctccaggggcaccattgaaatcc
tgagtgatgtgcagctgatcaagactggagacaaagtgggagccagcgaagccacgctgc
tgaacatgctcaacatctcccccttctcctttgggctggtcatccagcaggtgttcgaca
atggcagcactacaaccctgaagtgcttgaatcacagaggaaactctgcattctcgct
tcctggaggggtgtccgcaatggtgccagtgtctgtctgcagattggctacccaactggtg
catcagtacccattctatcatcaacgggtacaaacgagtcctggccttgctctgtggaga
cggattacaccttcccacttgctgaaaagggtcaaggccttcttggctgatccatctgcct
ttgtggctgctgcccctgtggctgctgccaccacagctgctcctgctgctgctgcagccc
cagctaagggtgaagccaaggaagagtcggaggagtcggacgaggatattgggatttggtc
tctttgactaatcaccaaaaagcaaccaacttagccagttttatttgcaaaaacaaggaaa
taaaggcttacttcttt

```

A12 Genarbeitsblatt *hGAPDH*

Vollständiger Name des Gens	<i>Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
Vorwärtsprimer:	5´ - agccacatcgctcagaca - 3´
Rückwärtsprimer:	5´ - gcccaatacgaccaaacc - 3´
Amplikonlänge:	66 bp
Verwendete Sonde:	Nr. 60

Sequenz:

M33197.1|M33197:EMBL|HIT000195501:H-InvDB Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA, complete cds.

```

gttcgacagtcagccgcatcttcttttgcgctcgccagccgagccacatcgctcagacacc
atggggaaggtgaaggtcggagtcacggatttggtcgtattgggcgcctggtcaccagg
gctgcttttaactctggtaaagtggatattggtgccatcaatgacccttcattgacctc
aactacatggtttacatgttccaatgatgccacccatggcaaattccatggcaccgtc
aaggctgagaacgggaagcttgtcatcaatggaaatcccatcaccatcttcaggagcga
gatccctccaaaatcaagtggggcgatgctggcgctgagtagctcgtggagtccactggc
gtcttcaccaccatggagaaggctggggctcatttgcaggggggagccaaaagggtcatc
atctctgccccctctgctgatgccccatgctcgtcatgggtgtgaaccatgagaagtat
gacaacagcctcaagatcatcagcaatgcctcctgcaccaccaactgcttagcaccctg
gccaaaggatccatgacaactttggtatcgtggaaggactcatgaccacagtcctatgcc
atcactgccaccagaagactgtggatggcccctccgggaaactgtggcgatggccgc
ggggctctccagaacatcatccctgctctactggcgctgccaaggctgtgggcaaggctc
atccctgagctgaacgggaagctcactggcatggccttcctgtgtcccactgccaacgtg
tcagtggtagcctgacctgccgtctagaaaaacctgccaatatgatgacatcaagaag
gtggtgaagcaggcgtcggagggccccctcaaggatcctgggctacactgagcaccag
gtggtctcctctgacttcaacagcgcacccactcctccacctttgacgctggggctggc
attgccctcaacgaccactttgtcaagctcatttcctgggtatgacaacgaatttggtac
agcaacaggggtggtggacctcatggccacatggcctccaaggagtaagaccctggacc
accagccccagcaagagcacaagaggaagagagaccctcactgctggggagtcctgc
cactcagtccccaccacactgaatctcccctcctcacagttgccatgtagaccctt
gaagaggggaggggcctagggagccgcaccttgtcatgtaccatcaataaagtacctgt
gctcaacc

```

A13 Genarbeitsblatt *hHPRT*

Vollständiger Name des Gens	<i>Homo sapiens hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
Vorwärtsprimer:	5'- tgacctgattattgcatacc -3'
Rückwärtsprimer:	5'- cgagcaagacgttcagtcct -3'
Amplikonlänge:	102 bp
Verwendete Sonde:	Nr. 73

Sequenz:

NM_000194.1 *Homo sapiens hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan syndrome) (HPRT1), mRNA.*

```
tcttgetgcgcctccgcctcctcctctgctccgccaccggcttcctcctcctgagcagtc
agcccgcgccggccggctccgttatggcgaccgcagccctggcgctcgtgattagtga
tgatgaaccagggttatgacctgattattgcatacctaatcattatgctgaggattt
ggaaaggggtgtttattcctcatggactaattatggacaggactgaacgtccttgctcgaga
tgtgatgaaggagatgggaggccatcacattgtagccctctgtgtgctcaaggggggcta
taaattccttctgctgacctgctggattacatcaaagcactgaatagaaatagtgatagatc
cattcctatgactgtagattttatcagactgaagagctattgtaatgaccagtcaacagg
ggacataaaaagtaattgggtggagatgatctctcaactttaactggaaagaatgtcctgat
tgtggaagatataattgacactggcaaaaacaatgcagactttgctttccttggtcaggca
gtataatccaaagatgggtcaaggtcgcaagcttgctgggtgaaaaggacccacgaagtgt
tggatataagccagactttgttggatttgaaattccagacaagtttgtttaggatatgc
ccttgactataatgaatacttcagggatttgaatcatgtttgtgtcattagtgaaactgg
aaaagcaaaatacaaagcctaagatgagagttcaagttgagtttggaacatctggagtc
ctattgacatcgccagtaaaattatcaatgttctagttctgtggccatctgcttagtaga
gctttttgcatgtatccttctaagaattttatctgttttgtactttagaaatgtcagttgc
tgcattcctaaactgtttatttgcactatgagcctatagactatcagttccctttgggcg
gattgttgtttaacttgtaaataaaaaattctcttaaaccacagcactattgagtgaaa
cattgaactcatatctgtaagaaataaagagaagatatattagtttttaattgggtattt
taatttttatatatgcaggaaagaatagaagtgattgaaatattgttaattataaccaccgt
gtgttagaaaagtaagaagcagtcattttcacatcaaagacagcatctaagaagttttg
ttctgtcctggaattatttttagtagtgtttcagtaatgttgactgtattttccaacttgt
tcaaattattaccagtgaatccttctgacagcagttcccttttaaatgcaaatcaataaatt
cccaaaaattt
```

A14 Primerliste

Name	Länge (nt)	GC-Gehalt (%)	Sequenz (5' -> 3')	Schmelztemperatur T _m (°C)
36B4_Fw	23	43,5	tctacaaccctgaagtgcttgat	58,9
36B4_Re	21	52,4	caatctgcagacagacactgg	59,8
Gapdh_F	18	55,6	agccacatcgctcagaca	56,0
Gapdh_R	19	52,6	gcccaatagcaccgcaatcc	56,7
HPRT_F	24	33,3	tgaccttgattatattgcatacc	55,9
HPRT_R	19	57,9	cgagcaagacggtcagtc	58,8
Bmal1_F	20	45,0	caggaaaaataggccgaatg	55,3
Bmal1_R	19	52,6	gcatgacacctctatcct	56,7
Per1_F	20	50,0	atggtccactgctgcatct	57,3
Per1_R	18	66,7	cggtcaggacctcctctg	60,5
Random-hexamer	6	k.A.	NNNNNN	k.A.
anchored-oligo(dT) ₁₈	18	k.A.	NVTTTTTTTTTTTTTTTTTT	k.A.

k.A. = keine Angabe möglich; N = A,C,G oder T; V = A, C oderG

Die Random-Hexamer-Primer sowie die anchored-oligo(dT)₁₈-Primer stammen aus dem Transcriptor First strand cDNA-Synthesekit der Firma Roche. Bei beiden können weder der GC-Gehalt, noch die Schmelztemperatur angegeben werden, da jeweils unterschiedliche Sequenzen vorliegen können.

Alle weiteren Primer wurden sowohl für die Block-Cycler-PCRs, als auch für die LightCycler[®]-PCRs verwendet. Hierbei betrug die Konzentration für die Block-Cycler-PCRs 10pmol/μl und die für die LightCycler[®]-PCRs 5pmol/μl.

A15 Durchgeführte Tests auf Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov

(Reihenfolge alphabetisch, nicht-normalverteilte Werte sind durch Fettdruck hervorgehoben)

Getestete Variable	Gruppe	N	Z	p
Alkohol (Gläser/Woche)	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,62	0,835
Alkohol (Gläser/Woche)	älter Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,52	0,952
Alkohol (Gläser/Woche)	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,58	0,890
Alkohol (Gläser/Woche)	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	0,65	0,789
Alkohol (Gläser/Woche)	Ältere Männer	14	0,63	0,825
Alkohol (Gläser/Woche)	Jüngere Frauen	10	0,99	0,279
Alkohol (Gläser/Woche)	Ältere Frauen	20	0,92	0,369
Alter (J.)	Ältere Männer	14	0,66	0,781
Alter (J.)	Ältere Frauen	20	0,41	0,996
Alter (J.)	Jüngere Frauen	10	0,51	0,957
Aufstehzeit (min)	Ältere Männer	14	0,91	0,375
Aufstehzeit (min)	Ältere Frauen	20	0,89	0,413
Aufstehzeit (min)	junge Frauen	10	0,57	0,898
Basisaktivitäten (MET)	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,50	0,965
Basisaktivitäten (MET)	älter Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,90	0,394
Basisaktivitäten (MET)	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,86	0,45
Basisaktivitäten (MET)	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	1,10	0,181
BMI (kg/m ²)	Ältere Männer	14	0,38	0,999
BMI (kg/m ²)	Ältere Frauen	20	0,50	0,965
BMI (kg/m ²)	Jüngere Frauen	10	0,70	0,717
CAR	Ältere Männer	14	0,64	0,807
CAR	Ältere Frauen	20	0,56	0,908
CAR	junge Frauen	10	0,62	0,842
CAR	ältere Männer, gute Schlafqualität		0,52	0,946
CAR	älter Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,41	0,996
CAR	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,56	0,915
CAR	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	0,60	0,868
Chronotyp (Punkte)	Ältere Männer	14	0,81	0,524
Chronotyp (Punkte)	Ältere Frauen	20	1,19	0,116
Chronotyp (Punkte)	Jüngere Frauen	10	0,52	0,951
Cortisol (µg/dl) - T0	Ältere Männer	14	0,58	0,894
Cortisol (µg/dl) - T15	Ältere Männer	14	0,42	0,994
Cortisol (µg/dl) - T30	Ältere Männer	14	0,76	0,616
Cortisol (µg/dl) - T45	Ältere Männer	14	0,76	0,603
Cortisol (µg/dl) - T60	Ältere Männer	14	0,79	0,559
Cortisol (µg/dl) - T0	Ältere Frauen	20	0,67	0,769
Cortisol (µg/dl) - T15	Ältere Frauen	20	0,66	0,779
Cortisol (µg/dl) - T30	Ältere Frauen	20	0,86	0,458
Cortisol (µg/dl) - T45	Ältere Frauen	20	1,11	0,171
Cortisol (µg/dl) - T60	Ältere Frauen	20	1,14	0,146
Cortisol (µg/dl) - T0	junge Frauen	10	0,50	0,962
Cortisol (µg/dl) - T15	junge Frauen	10	0,82	0,511

Anhang

Cortisol (µg/dl) - T30	junge Frauen	10	0,97	0,303
Cortisol (µg/dl) - T45	junge Frauen	10	1,17	0,128
Cortisol (µg/dl) - T60	junge Frauen	10	0,61	0,853
Cortisol (µg/dl) - T0	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,59	0,880
Cortisol (µg/dl) - T15	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,42	0,994
Cortisol (µg/dl) - T30	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,37	0,999
Cortisol (µg/dl) - T45	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,64	0,814
Cortisol (µg/dl) - T60	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,63	0,818
Cortisol (µg/dl) - T0	älter Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,51	0,960
Cortisol (µg/dl) - T15	älter Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,55	0,928
Cortisol (µg/dl) - T30	älter Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,61	0,847
Cortisol (µg/dl) - T45	älter Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,82	0,512
Cortisol (µg/dl) - T60	älter Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,82	0,507
Cortisol (µg/dl) - T0	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,44	0,990
Cortisol (µg/dl) - T15	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,47	0,980
Cortisol (µg/dl) - T30	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,45	0,989
Cortisol (µg/dl) - T45	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,65	0,787
Cortisol (µg/dl) - T60	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,78	0,632
Cortisol (µg/dl) - T0	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	0,63	0,828
Cortisol (µg/dl) - T15	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	0,78	0,576
Cortisol (µg/dl) - T30	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	0,78	0,576
Cortisol (µg/dl) - T45	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	0,95	0,330
Cortisol (µg/dl) - T60	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	0,85	0,463
DLMO	Ältere Männer	14	1,22	0,104
DLMO	Ältere Frauen	20	1,69	0,007
DLMO	junge Frauen	10	1,53	0,019
DLMO-Schwelle (pg/ml)	Ältere Männer	14	1,35	0,052
DLMO-Schwelle (pg/ml)	Ältere Frauen	20	1,90	0,001
DLMO-Schwelle (pg/ml)	junge Frauen	10	1,59	0,013
DLMO-Schwelle (pg/ml)	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	1,18	0,124
DLMO-Schwelle (pg/ml)	älter Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,74	0,639
DLMO-Schwelle (pg/ml)	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	1,41	0,037
DLMO-Schwelle (pg/ml)	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	1,33	0,058
DLMO-Zeitpunkt (min)	Ältere Männer	14	0,52	0,948
DLMO-Zeitpunkt (min)	Ältere Frauen	20	0,67	0,759
DLMO-Zeitpunkt (min)	junge Frauen	10	0,61	0,851
DLMO-Zeitpunkt (min)	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,41	0,996
DLMO-Zeitpunkt (min)	älter Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,35	1,000
DLMO-Zeitpunkt (min)	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,59	0,881
DLMO-Zeitpunkt (min)	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	0,41	0,995
Freizeitaktivitäten (MET)	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,72	0,681
Freizeitaktivitäten (MET)	älter Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,89	0,411
Freizeitaktivitäten (MET)	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,92	0,372
Freizeitaktivitäten (MET)	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	0,76	0,611
Gesamtaktivität (MET)	Ältere Männer	14	0,98	0,295
Gesamtaktivität (MET)	Jüngere Frauen	10	0,79	0,567
Gesamtaktivität (MET)	Ältere Frauen	20	0,64	0,803

Anhang

Gesamtaktivität (MET)	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,57	0,901
Gesamtaktivität (MET)	ältere Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,66	0,785
Gesamtaktivität (MET)	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,51	0,960
Gesamtaktivität (MET)	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	0,41	0,996
hBMAL1/h36B4-Ratio - T08	Ältere Männer	11	0,85	0,469
hBMAL1/h36B4-Ratio - T12	Ältere Männer	11	0,62	0,844
hBMAL1/h36B4-Ratio - T16	Ältere Männer	11	0,59	0,878
hBMAL1/h36B4-Ratio - T20	Ältere Männer	11	0,66	0,776
hBMAL1/h36B4-Ratio - T22	Ältere Männer	11	0,82	0,515
hBMAL1/h36B4-Ratio - T24	Ältere Männer	11	0,61	0,852
hBMAL1/h36B4-Ratio - T08	Ältere Frauen	13	0,94	0,345
hBMAL1/h36B4-Ratio - T12	Ältere Frauen	13	0,73	0,662
hBMAL1/h36B4-Ratio - T16	Ältere Frauen	13	0,96	0,321
hBMAL1/h36B4-Ratio - T20	Ältere Frauen	13	1,28	0,077
hBMAL1/h36B4-Ratio - T22	Ältere Frauen	13	1,55	0,016
hBMAL1/h36B4-Ratio - T24	Ältere Frauen	13	1,85	0,002
hBMAL1/h36B4-Ratio - T08	Jüngere Frauen	10	0,71	0,694
hBMAL1/h36B4-Ratio - T12	Jüngere Frauen	10	0,84	0,484
hBMAL1/h36B4-Ratio - T16	Jüngere Frauen	10	0,74	0,643
hBMAL1/h36B4-Ratio - T20	Jüngere Frauen	10	1,00	0,272
hBMAL1/h36B4-Ratio - T22	Jüngere Frauen	10	1,04	0,227
hBMAL1/h36B4-Ratio - T24	Jüngere Frauen	10	0,74	0,650
hBMAL1/h36B4-Ratio - T08	ältere Männer, gute Schlafqualität	7	0,50	0,965
hBMAL1/h36B4-Ratio - T12	ältere Männer, gute Schlafqualität	7	0,61	0,855
hBMAL1/h36B4-Ratio - T16	ältere Männer, gute Schlafqualität	7	0,56	0,917
hBMAL1/h36B4-Ratio - T20	ältere Männer, gute Schlafqualität	7	0,72	0,677
hBMAL1/h36B4-Ratio - T22	ältere Männer, gute Schlafqualität	7	0,59	0,878
hBMAL1/h36B4-Ratio - T24	ältere Männer, gute Schlafqualität	7	0,49	0,969
hBMAL1/h36B4-Ratio - T08	ältere Männer, schlechte Schlafqualität	4	0,73	0,660
hBMAL1/h36B4-Ratio - T12	ältere Männer, schlechte Schlafqualität	4	0,40	0,997
hBMAL1/h36B4-Ratio - T16	ältere Männer, schlechte Schlafqualität	4	0,46	0,983
hBMAL1/h36B4-Ratio - T20	ältere Männer, schlechte Schlafqualität	4	0,79	0,560
hBMAL1/h36B4-Ratio - T22	ältere Männer, schlechte Schlafqualität	4	0,53	0,941
hBMAL1/h36B4-Ratio - T24	ältere Männer, schlechte Schlafqualität	4	0,49	0,968
hBMAL1/h36B4-Ratio - T08	ältere Frauen, gute Schlafqualität	5	0,81	0,528
hBMAL1/h36B4-Ratio - T12	ältere Frauen, gute Schlafqualität	5	0,40	0,997
hBMAL1/h36B4-Ratio - T16	ältere Frauen, gute Schlafqualität	5	0,75	0,621
hBMAL1/h36B4-Ratio - T20	ältere Frauen, gute Schlafqualität	5	0,40	0,997
hBMAL1/h36B4-Ratio - T22	ältere Frauen, gute Schlafqualität	5	0,50	0,964
hBMAL1/h36B4-Ratio - T24	ältere Frauen, gute Schlafqualität	5	0,80	0,547
hBMAL1/h36B4-Ratio - T08	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	8	0,88	0,423
hBMAL1/h36B4-Ratio - T12	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	8	0,63	0,825
hBMAL1/h36B4-Ratio - T16	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	8	0,80	0,537
hBMAL1/h36B4-Ratio - T20	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	8	1,05	0,222
hBMAL1/h36B4-Ratio - T22	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	8	1,08	0,196
hBMAL1/h36B4-Ratio - T24	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	8	1,41	0,037
hPER1/h36B4-Ratio - T08	Ältere Männer	10	0,42	0,994
hPER1/h36B4-Ratio - T12	Ältere Männer	10	0,42	0,994

Anhang

hPER1/h36B4-Ratio - T16	Ältere Männer	10	0,78	0,580
hPER1/h36B4-Ratio - T20	Ältere Männer	10	0,41	0,997
hPER1/h36B4-Ratio - T22	Ältere Männer	10	0,46	0,984
hPER1/h36B4-Ratio - T24	Ältere Männer	10	0,68	0,746
hPER1/h36B4-Ratio - T08	Ältere Frauen	12	0,67	0,756
hPER1/h36B4-Ratio - T12	Ältere Frauen	12	0,77	0,588
hPER1/h36B4-Ratio - T16	Ältere Frauen	12	0,62	0,832
hPER1/h36B4-Ratio - T20	Ältere Frauen	12	0,75	0,630
hPER1/h36B4-Ratio - T22	Ältere Frauen	12	0,61	0,849
hPER1/h36B4-Ratio - T24	Ältere Frauen	12	0,59	0,874
hPER1/h36B4-Ratio - T08	Jüngere Frauen	10	0,42	0,995
hPER1/h36B4-Ratio - T12	Jüngere Frauen	10	0,58	0,888
hPER1/h36B4-Ratio - T16	Jüngere Frauen	10	0,67	0,758
hPER1/h36B4-Ratio - T20	Jüngere Frauen	10	0,80	0,551
hPER1/h36B4-Ratio - T22	Jüngere Frauen	10	0,72	0,672
hPER1/h36B4-Ratio - T24	Jüngere Frauen	10	0,89	0,404
hPER1/h36B4-Ratio - T08	ältere Männer, gute Schlafqualität	6	0,51	0,956
hPER1/h36B4-Ratio - T12	ältere Männer, gute Schlafqualität	6	0,44	0,990
hPER1/h36B4-Ratio - T16	ältere Männer, gute Schlafqualität	6	0,53	0,939
hPER1/h36B4-Ratio - T20	ältere Männer, gute Schlafqualität	6	0,55	0,925
hPER1/h36B4-Ratio - T22	ältere Männer, gute Schlafqualität	6	0,46	0,983
hPER1/h36B4-Ratio - T24	ältere Männer, gute Schlafqualität	6	0,42	0,995
hPER1/h36B4-Ratio - T08	älter Männer, schlechte Schlafqualität	4	0,65	0,789
hPER1/h36B4-Ratio - T12	älter Männer, schlechte Schlafqualität	4	0,45	0,986
hPER1/h36B4-Ratio - T16	älter Männer, schlechte Schlafqualität	4	0,60	0,869
hPER1/h36B4-Ratio - T20	älter Männer, schlechte Schlafqualität	4	0,39	0,998
hPER1/h36B4-Ratio - T22	älter Männer, schlechte Schlafqualität	4	0,47	0,981
hPER1/h36B4-Ratio - T24	älter Männer, schlechte Schlafqualität	4	0,56	0,917
hPER1/h36B4-Ratio - T08	ältere Frauen, gute Schlafqualität	5	0,54	0,933
hPER1/h36B4-Ratio - T12	ältere Frauen, gute Schlafqualität	5	0,48	0,975
hPER1/h36B4-Ratio - T16	ältere Frauen, gute Schlafqualität	5	0,51	0,957
hPER1/h36B4-Ratio - T20	ältere Frauen, gute Schlafqualität	5	0,43	0,993
hPER1/h36B4-Ratio - T22	ältere Frauen, gute Schlafqualität	5	0,45	0,988
hPER1/h36B4-Ratio - T24	ältere Frauen, gute Schlafqualität	5	0,51	0,957
hPER1/h36B4-Ratio - T08	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	7	0,59	0,876
hPER1/h36B4-Ratio - T12	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	7	0,65	0,791
hPER1/h36B4-Ratio - T16	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	7	0,63	0,828
hPER1/h36B4-Ratio - T20	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	7	0,75	0,628
hPER1/h36B4-Ratio - T22	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	7	0,64	0,801
hPER1/h36B4-Ratio - T24	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	7	0,71	0,699
Kaffee/Schwarztee (Tassen/Woche)	Ältere Männer	14	0,58	0,893
Kaffee/Schwarztee (Tassen/Woche)	Jüngere Frauen	10	0,85	0,473
Kaffee/Schwarztee (Tassen/Woche)	Ältere Frauen	20	0,50	0,964
Körpergewicht (kg)	Ältere Männer	14	1,03	0,244
Körpergewicht (kg)	Ältere Frauen	20	0,71	0,699
Körpergewicht (kg)	Jüngere Frauen	10	0,62	0,831

Anhang

Körperhöhe (cm)	Ältere Männer	14	0,44	0,991
Körperhöhe (cm)	Ältere Frauen	20	0,40	0,998
Körperhöhe (cm)	Jüngere Frauen	10	0,83	0,493
Körperkerntemperatur (°C) - T08	Ältere Männer	14	0,80	0,541
Körperkerntemperatur (°C) - T12	Ältere Männer	14	0,56	0,908
Körperkerntemperatur (°C) - T16	Ältere Männer	14	0,55	0,923
Körperkerntemperatur (°C) - T17	Ältere Männer	14	0,74	0,647
Körperkerntemperatur (°C) - T18	Ältere Männer	14	0,69	0,723
Körperkerntemperatur (°C) - T19	Ältere Männer	14	0,75	0,632
Körperkerntemperatur (°C) - T20	Ältere Männer	14	0,79	0,564
Körperkerntemperatur (°C) - T21	Ältere Männer	14	0,56	0,916
Körperkerntemperatur (°C) - T22	Ältere Männer	14	0,93	0,355
Körperkerntemperatur (°C) - T23	Ältere Männer	14	0,85	0,463
Körperkerntemperatur (°C) - T24	Ältere Männer	14	0,95	0,324
Körperkerntemperatur (°C) - T08	Ältere Frauen	20	0,45	0,988
Körperkerntemperatur (°C) - T12	Ältere Frauen	20	0,63	0,823
Körperkerntemperatur (°C) - T16	Ältere Frauen	20	0,84	0,481
Körperkerntemperatur (°C) - T17	Ältere Frauen	20	0,71	0,689
Körperkerntemperatur (°C) - T18	Ältere Frauen	20	0,40	0,997
Körperkerntemperatur (°C) - T19	Ältere Frauen	20	0,63	0,819
Körperkerntemperatur (°C) - T20	Ältere Frauen	20	0,46	0,985
Körperkerntemperatur (°C) - T21	Ältere Frauen	20	0,78	0,585
Körperkerntemperatur (°C) - T22	Ältere Frauen	20	0,89	0,410
Körperkerntemperatur (°C) - T23	Ältere Frauen	20	0,46	0,982
Körperkerntemperatur (°C) - T24	Ältere Frauen	20	0,53	0,944
Körperkerntemperatur (°C) - T08	junge Frauen	10	0,81	0,522
Körperkerntemperatur (°C) - T12	junge Frauen	10	0,87	0,439
Körperkerntemperatur (°C) - T16	junge Frauen	10	0,71	0,698
Körperkerntemperatur (°C) - T17	junge Frauen	10	0,29	1,000
Körperkerntemperatur (°C) - T18	junge Frauen	10	0,57	0,902
Körperkerntemperatur (°C) - T19	junge Frauen	10	0,66	0,779
Körperkerntemperatur (°C) - T20	junge Frauen	10	0,68	0,740
Körperkerntemperatur (°C) - T21	junge Frauen	10	0,38	0,999
Körperkerntemperatur (°C) - T22	junge Frauen	10	0,57	0,903
Körperkerntemperatur (°C) - T23	junge Frauen	10	0,68	0,748
Körperkerntemperatur (°C) - T24	junge Frauen	10	0,54	0,934
Körperkerntemperatur (°C) - T08	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,75	0,624
Körperkerntemperatur (°C) - T12	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,42	0,995
Körperkerntemperatur (°C) - T16	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,64	0,806
Körperkerntemperatur (°C) - T17	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,80	0,563
Körperkerntemperatur (°C) - T18	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,80	0,541
Körperkerntemperatur (°C) - T19	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,77	0,590
Körperkerntemperatur (°C) - T20	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,56	0,914
Körperkerntemperatur (°C) - T21	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,72	0,674
Körperkerntemperatur (°C) - T22	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,83	0,491
Körperkerntemperatur (°C) - T23	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,76	0,603
Körperkerntemperatur (°C) - T24	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,82	0,508
Körperkerntemperatur (°C) - T08	älter Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,51	0,958
Körperkerntemperatur (°C) - T12	älter Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,67	0,758
Körperkerntemperatur (°C) - T16	älter Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,55	0,918
Körperkerntemperatur (°C) - T17	älter Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,41	0,996
Körperkerntemperatur (°C) - T18	älter Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,68	0,745

Anhang

Körperkerntemperatur (°C) - T19	älter Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,49	0,971
Körperkerntemperatur (°C) - T20	älter Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,72	0,680
Körperkerntemperatur (°C) - T21	älter Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,39	0,998
Körperkerntemperatur (°C) - T22	älter Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,55	0,921
Körperkerntemperatur (°C) - T23	älter Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,52	0,951
Körperkerntemperatur (°C) - T24	älter Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,47	0,981
Körperkerntemperatur (°C) - T08	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,56	0,910
Körperkerntemperatur (°C) - T12	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,46	0,985
Körperkerntemperatur (°C) - T16	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,80	0,538
Körperkerntemperatur (°C) - T17	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,65	0,788
Körperkerntemperatur (°C) - T18	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,70	0,715
Körperkerntemperatur (°C) - T19	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,41	0,997
Körperkerntemperatur (°C) - T20	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,39	0,998
Körperkerntemperatur (°C) - T21	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,54	0,935
Körperkerntemperatur (°C) - T22	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,69	0,733
Körperkerntemperatur (°C) - T23	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,40	0,997
Körperkerntemperatur (°C) - T24	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,52	0,950
Körperkerntemperatur (°C) - T08	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	0,37	0,999
Körperkerntemperatur (°C) - T12	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	0,80	0,541
Körperkerntemperatur (°C) - T16	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	0,83	0,499
Körperkerntemperatur (°C) - T17	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	0,59	0,877
Körperkerntemperatur (°C) - T18	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	0,55	0,920
Körperkerntemperatur (°C) - T19	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	0,52	0,948
Körperkerntemperatur (°C) - T20	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	0,60	0,860
Körperkerntemperatur (°C) - T21	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	0,76	0,610
Körperkerntemperatur (°C) - T22	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	0,63	0,823
Körperkerntemperatur (°C) - T23	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	0,59	0,880
Körperkerntemperatur (°C) - T24	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	0,47	0,981
Melatonin (pg/ml) - T17	Ältere Männer	14	1,47	0,026
Melatonin (pg/ml) - T18	Ältere Männer	14	0,95	0,326
Melatonin (pg/ml) - T19	Ältere Männer	14	1,52	0,019
Melatonin (pg/ml) - T20	Ältere Männer	14	1,10	0,174
Melatonin (pg/ml) - T21	Ältere Männer	14	0,79	0,569
Melatonin (pg/ml) - T22	Ältere Männer	14	0,92	0,360
Melatonin (pg/ml) - T23	Ältere Männer	14	1,01	0,262
Melatonin (pg/ml) - T24	Ältere Männer	14	1,55	0,016
Melatonin (pg/ml) - T17	Ältere Frauen	20	1,27	0,08
Melatonin (pg/ml) - T18	Ältere Frauen	20	1,71	0,006
Melatonin (pg/ml) - T19	Ältere Frauen	20	1,86	0,002
Melatonin (pg/ml) - T20	Ältere Frauen	20	1,77	0,004
Melatonin (pg/ml) - T21	Ältere Frauen	20	1,54	0,017
Melatonin (pg/ml) - T22	Ältere Frauen	20	1,06	0,212
Melatonin (pg/ml) - T23	Ältere Frauen	20	1,20	0,112
Melatonin (pg/ml) - T24	Ältere Frauen	20	0,92	0,367
Melatonin (pg/ml) - T17	junge Frauen	10	1,45	0,031
Melatonin (pg/ml) - T18	junge Frauen	10	1,34	0,055
Melatonin (pg/ml) - T19	junge Frauen	10	1,62	0,011
Melatonin (pg/ml) - T20	junge Frauen	10	1,49	0,023
Melatonin (pg/ml) - T21	junge Frauen	10	1,41	0,038
Melatonin (pg/ml) - T22	junge Frauen	10	1,44	0,031
Melatonin (pg/ml) - T23	junge Frauen	10	1,17	0,128
Melatonin (pg/ml) - T24	junge Frauen	10	1,02	0,253

Anhang

Melatonin (pg/ml) - T17	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	1,28	0,077
Melatonin (pg/ml) - T18	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,59	0,874
Melatonin (pg/ml) - T19	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	1,18	0,125
Melatonin (pg/ml) - T20	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,91	0,385
Melatonin (pg/ml) - T21	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,66	0,771
Melatonin (pg/ml) - T22	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,73	0,664
Melatonin (pg/ml) - T23	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,80	0,547
Melatonin (pg/ml) - T24	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	1,29	0,072
Melatonin (pg/ml) - T17	ältere Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,61	0,856
Melatonin (pg/ml) - T18	ältere Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,78	0,585
Melatonin (pg/ml) - T19	ältere Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,68	0,743
Melatonin (pg/ml) - T20	ältere Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,88	0,417
Melatonin (pg/ml) - T21	ältere Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,58	0,896
Melatonin (pg/ml) - T22	ältere Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,60	0,865
Melatonin (pg/ml) - T23	ältere Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,49	0,971
Melatonin (pg/ml) - T24	ältere Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,45	0,986
Melatonin (pg/ml) - T17	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,85	0,470
Melatonin (pg/ml) - T18	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	1,33	0,060
Melatonin (pg/ml) - T19	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	1,45	0,029
Melatonin (pg/ml) - T20	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,77	0,591
Melatonin (pg/ml) - T21	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,93	0,355
Melatonin (pg/ml) - T22	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	1,16	0,135
Melatonin (pg/ml) - T23	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	1,14	0,148
Melatonin (pg/ml) - T24	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,95	0,330
Melatonin (pg/ml) - T17	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	1,02	0,252
Melatonin (pg/ml) - T18	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	1,12	0,166
Melatonin (pg/ml) - T19	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	1,25	0,089
Melatonin (pg/ml) - T20	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	1,45	0,030
Melatonin (pg/ml) - T21	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	1,30	0,069
Melatonin (pg/ml) - T22	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	0,59	0,875
Melatonin (pg/ml) - T23	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	0,57	0,901
Melatonin (pg/ml) - T24	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	0,53	0,940
Schlafdauer (min)	Ältere Männer	14	0,95	0,331
Schlafdauer (min)	Ältere Frauen	20	0,81	0,527
Schlafdauer (min)	junge Frauen	10	0,45	0,987
Schlafqualität (Punkte)	Ältere Männer	14	0,61	0,848
Schlafqualität (Punkte)	Ältere Frauen	20	0,82	0,511
Schlafqualität (Punkte)	Jüngere Frauen	10	0,76	0,606
Sport (MET)	ältere Männer, gute Schlafqualität	9	0,45	0,987
Sport (MET)	ältere Männer, schlechte Schlafqualität	5	0,67	0,755
Sport (MET)	ältere Frauen, gute Schlafqualität	9	0,80	0,539
Sport (MET)	ältere Frauen, schlechte Schlafqualität	11	0,94	0,341
Tagesschläfrigkeit (Punkte)	Ältere Männer	14	0,63	0,823
Tagesschläfrigkeit (Punkte)	Ältere Frauen	20	0,90	0,408
Tagesschläfrigkeit (Punkte)	Jüngere Frauen	10	0,68	0,749
Zeitraum im Freien	Ältere Männer	14	1,15	0,139
Zeitraum im Freien	Jüngere Frauen	10	0,83	0,498
Zeitraum im Freien	Ältere Frauen	19	1,16	0,134

10 Danksagung

Diese Doktorarbeit entstand am Zoologischen Institut der Christian Albrechts Universität zu Kiel in der Abteilung für Humanbiologie unter der Leitung von Frau Professor Dr. M. Dittmar. Bei ihr möchte ich mich für mehrere Dinge bedanken. Einerseits für die Bereitstellung des Themas, die gute Betreuung, die Unterstützung bei der Anwendung des Statistikprogramms SPSS, und der Möglichkeit zum selbständigen Arbeiten, andererseits aber auch für ihre ruhige und verständnisvolle Art auch bei unvorhergesehenen Ereignissen.

Herrn Prof. Dr. T. Röder danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur und seine Bereitschaft, das Gutachten für diese Arbeit in einem verkürzten Zeitraum zu erstellen.

Herrn Professor Dr. M. Leippe danke ich für die Übernahme der Prüfungskommissionsleitung.

Herrn Prof. Dr. G.B. Hartl danke ich für seine Bereitschaft, ebenfalls Teil der Prüfungskommission zu sein.

Dem Zentrum für Biochemie und Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel danke ich für die Möglichkeit, ihren Gerätepark, speziell den LightCycler und den Tecan Reader, kostenlos nutzen zu können. Die Arbeiten an diesen Geräten machten einen großen Teil meiner Arbeit aus, der sonst so nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt allen Studienteilnehmern und –teilnehmerinnen. Ihnen möchte ich für die freiwillige und entgeltlose Teilnahme an dieser auch für sie zeitaufwendigen Studie danken. Ihre Teilnahme und die damit verbundene Einhaltung der Testbedingungen stellte einen grundlegenden Faktor zum Gelingen dieser Arbeit dar. Ohne ihr Interesse und ihren zeitliche Einsatz wäre diese Studie nicht zustande gekommen.

Auch privat habe ich einige Unterstützung erfahren, für die ich mich bedanken möchte. So sei hier meiner Familie, speziell meinen Eltern und meiner Schwester, sowie meinem Lebensgefährten Tilo Brück gedankt, die mir stets zur Seite standen und mich unterstützten.

Meinen Freundinnen Silja Fuchs, Sabine Milde, Christina Lange und Christiane Scholz danke ich besonders für den anregenden Gedankenaustausch bezüglich beruflicher und privater Themen und der Ablenkung zur richtigen Zeit.

11 Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit, abgesehen von der Beratung durch meine Betreuerin, Frau Prof. Dr. M. Dittmar, nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Ich habe keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet.

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden und hat weder ganz noch in Teilen bereits einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Teile dieser Arbeit wurden bereits im Rahmen eines Kongresses veröffentlicht bzw. sind für einen Kongress angemeldet:

- 1.) 8. Internationaler Kongress der Gesellschaft für Anthropologie 2009
 - A) Vortrag: Older females with sleep problems have lowered melatonin production and accelerated body temperature decrease in the evening
 - B) Poster: Cortisol awakening response is positively related with daytime sleepiness and negatively with sleep duration in older women
- 2.) 10. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gerontologie und Geriatrie 2010
Poster: The evening profile of older poor sleeping women is characterized by later melatonin onset, lower melatonin production and lower core body temperature, compared with good sleepers

Kiel, d.
