

ZUSAMMENHANG ZWISCHEN CIRCADIANER
RHYTHMIK, OXIDATIVEM STRESS UND LEBENSSTIL
BEI JÜNGEREN UND ÄLTEREN GESUNDEN FRAUEN

DISSERTATION

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

vorgelegt von

DANIELA TÖBELMANN

Kiel

Januar 2020

Referentin: Prof. Dr. M. Dittmar

Korreferent: Prof. Dr. A. Klettner

Tag der mündlichen Prüfung: 06. April 2020

Zum Druck genehmigt: 06. April 2020

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	V
Abstract	VII
1 Einleitung	1
1.1 Chronobiologie	1
1.2 Circadiane Rhythmen	2
1.3 Circadiane Uhr des Menschen	3
1.4 Der zentrale circadiane Schrittmacher – Nucleus suprachiasmaticus	4
1.5 Uhrengene und die molekulare Rückkopplungsschleife	5
1.6 Melatonin	7
1.6.1 Aufgabe und Wirkung	7
1.6.2 Synthese	8
1.6.3 Circadiane Rhythmik und Einflussfaktoren	10
1.7 Freie Radikale, oxidativer Stress und antioxidative Systeme	12
1.7.1 Entstehung von freien Radikalen	12
1.7.2 Wirkungen von freien Radikalen, oxidativer Stress und antioxidative Systeme ...	14
1.7.3 Superoxiddismutase 1	16
1.7.3.1 Aufgabe und Vorkommen	16
1.7.3.2 Circadiane Rhythmik und Regulation der SOD1	17
1.7.4 Altern	17
1.7.4.1 Theorie des Alterns	17
1.7.4.2 Auswirkungen auf das Altern	19
1.8 Körpertemperatur	21
1.8.1 Körperkerntemperatur	21
1.8.2 Periphere Hauttemperatur	22
2 Fragestellung	24
3 Studiendesign und Durchführung	26
4 Probanden	30
5 Material	33
6 Methoden	36
6.1 Fragebogenerhebungen und Schlaftagebuch	36

6.2	Anthropometrie und physiologische Methoden	39
6.2.1	Anthropometrie	39
6.2.2	Bioelektrische Impedanzanalyse.....	39
6.2.3	Messung der Temperatur	41
6.3	Hormonanalyse.....	42
6.3.1	Speichelprobensammlung für Melatoninanalyse.....	42
6.3.2	Enzymimmunoassay für Melatonin	42
6.4	Oxidative Stressanalyse	44
6.4.1	Speichelprobensammlung für oxidative Stressanalyse	44
6.4.2	Enzymimmunoassay für oxidativen Stress.....	44
6.5	Molekulargenetische Methoden	47
6.5.1	Sammeln von Mundschleimhautproben für molekulargenetische Analysen	47
6.5.2	Haushaltsgen, Zielgene und Messzeitpunkte	47
6.5.3	RNA-Extraktion.....	48
6.5.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	48
6.5.5	Enzymatischer Verdau	49
6.5.6	Synthese komplementärer DNA	49
6.5.7	Primerdesign und Sonden.....	50
6.5.8	Gradienten-PCR und Etablierung der LightCycler-PCR für <i>hSod1</i>	51
6.5.9	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion	53
6.6	Proteinbiochemische Methoden	57
6.6.1	Sammeln von Mundschleimhautproben für proteinbiochemische Analysen.....	57
6.6.2	Proteinextraktion	57
6.6.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen	58
6.6.4	Auswahl von Haushaltprotein, Zielproteinen und Messzeitpunkten	59
6.6.5	Probenvorbereitung und Gele gießen	59
6.6.6	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	60
6.6.7	Western Blot und Immunoblot.....	61
6.6.8	Entwicklung und Belichtung der Blots	63
6.6.9	Densitometrische Bestimmung und Berechnung.....	64
6.7	Statistische Methoden.....	65
7	Ergebnisse.....	67
7.1	Methodische Aspekte	67
7.1.1	Etablierung des <i>hSod1</i> -Assays.....	67

7.1.2	Erstellung von Standardkurven und Ermittlung der Effizienzen.....	68
7.1.3	Etablierung des Western Blots.....	71
7.2	Deskriptive Merkmale der Probanden	72
7.2.1	Altersverteilung im Probandenkollektiv	72
7.2.2	Anthropometrische Merkmale und Körperzusammensetzung.....	72
7.2.3	Verteilung der Chronotypen	74
7.2.4	Schlafqualität, Tagesschläfrigkeit und Nickerchen	75
7.2.5	Lebensqualität und Stress.....	76
7.2.6	Lebensstil: Gesundheit, Ernährung, Tageslicht und Körperliche Aktivität	78
7.2.7	Art des Berufs.....	83
7.3	Charakterisierung und Vergleich circadianer Merkmale zwischen Altersgruppen	83
7.3.1	Körperkerntemperatur und periphere Hauttemperatur.....	83
7.3.2	<i>hBmal1</i> -Gen, <i>hSod1</i> -Gen und SOD1-Protein	89
7.3.3	Oxidativer Stress und Melatonin	95
7.4	Zusammenhänge zwischen Merkmalen	99
7.4.1	Zusammenhänge zwischen Gen- und Proteinexpression.....	99
7.4.2	Zusammenhänge von oxidativem Stress und Melatonin mit <i>hBmal1</i> , <i>hSod1</i> und SOD1.....	103
7.4.3	Zusammenhänge zwischen den Lebensstil betreffenden Variablen und <i>hBmal1</i> -Gen, <i>hSod1</i> -Gen und SOD1-Protein	111
7.4.4	Zusammenhänge zwischen den Lebensstil betreffenden Variablen und Melatonin	114
7.4.5	Zusammenhänge zwischen den Lebensstil betreffenden Variablen und oxidativem Stress	115
7.4.6	Zusammenhänge zwischen Lebensstil-Parametern	117
7.4.7	Zusammenhänge mit dem Alter	118
8	Diskussion.....	121
8.1	Unterschiede zwischen den Altersgruppen in Bezug auf circadiane Merkmalssysteme.....	121
8.1.1	Körperkerntemperatur und periphere Hauttemperatur.....	121
8.1.2	Kurvenverläufe von <i>hBmal1</i> - und <i>hSod1</i> -mRNAs sowie SOD1-Protein.....	122
8.1.3	Oxidativer Stress	124
8.1.4	Melatonin.....	125
8.1.4.1	Circadiane Rhythmik von Melatonin	125
8.1.4.2	Melatoninexpression im Vergleich zwischen jüngeren und älteren Frauen..	125

8.1.5	Beantwortung der 1. Leitfrage.....	127
8.2	Zusammenhänge zwischen den circadianen Merkmalen	128
8.2.1	Zusammenhänge zwischen <i>hBmal1</i> - und <i>hSod1</i> -mRNAs und SOD1-Protein	128
8.2.2	Zusammenhänge mit oxidativem Stress.....	130
8.2.3	Zusammenhänge mit Melatonin.....	132
8.2.4	Beantwortung der 2. Leitfrage.....	134
8.3	Zusammenhänge zwischen altersbedingten Unterschieden und dem Lebensstil	135
8.3.1	Lebensstil betreffende Parameter	135
8.3.2	Zusammenhang zwischen <i>hBmal1</i> -Gen, <i>hSod1</i> -Gen und SOD1-Protein mit dem Lebensstil.....	137
8.3.3	Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und dem Lebensstil	139
8.3.4	Zusammenhang zwischen Melatonin und dem Lebensstil.....	140
8.3.5	Beantwortung der 3. Leitfrage.....	142
8.4	Methodenkritik	143
8.5	Ausblick.....	146
9	Literaturverzeichnis.....	148
10	Abkürzungsverzeichnis	169
11	Abbildungsverzeichnis.....	171
12	Tabellenverzeichnis.....	173
13	Anhang	176
	Danksagung	177
	Erklärung.....	178

ZUSAMMENFASSUNG

Die Lebenserwartung steigt kontinuierlich an, sodass gesundes Altern ein aktuelles Thema ist. Die Zunahme an oxidativem Stress (OS), der Proteine, Lipide und Erbgut schädigt, wird als eine Hauptursache für das Altern angesehen. Freie Antioxidantien, wie Melatonin, sowie antioxidative Enzyme, wie die Superoxiddismutase 1 (SOD1), wirken OS entgegen. Dabei zeigen sowohl Melatonin als auch die SOD1 circadiane Rhythmen. Das Uhrengen *hBmal1* ist beteiligt an der Regulation der circadianen Rhythmik zahlreicher Uhrengen-kontrollierter Gene. Mäuse, denen das *mBmal1*-Gen fehlte, zeigten verfrühte Alterserscheinungen, die mit einer verringerten Expression der SOD1 in Zusammenhang stehen könnten. Ziel dieser Arbeit war, herauszufinden, ob bei jüngeren und älteren Menschen ein Zusammenhang zwischen dem Uhrengen *hBmal1* und dem Gen für die SOD1 besteht. Ferner wurden Zusammenhänge mit dem SOD1-Protein, OS, Melatonin und lebensstilbezogenen Parametern untersucht.

Hierzu wurden 21 jüngeren ($23,7 \pm 2,3$ Jahre) und 21 älteren ($66,8 \pm 5,7$ Jahre) gesunden Frauen zu sechs Zeitpunkten (08, 12, 16, 24, 04 Uhr) Mundschleimhautzellen (MSH) und Speichel entnommen. Aus MSH wurden mRNA und Proteine zur quantitativen Bestimmung der Genexpression (*hBmal1* und *hSod1*) und der Proteinsynthese (SOD1) extrahiert. Die quantitative Bestimmung basierte auf Echtzeit-Polymerasekettenreaktionen und Western Blots mit anschließender Densitometrie. Im Speichel wurden mittels Enzymimmunoassays (ELISA) OS- und Melatoninkonzentrationen bestimmt. Darüber hinaus wurden Körpertemperaturdaten aufgezeichnet, anthropometrische Merkmale bestimmt und lebensstilbezogene Parameter mithilfe von Fragebögen ermittelt.

Diese Arbeit zeigte, dass die Konzentrationen der mRNA von *hBmal1* und *hSod1* sehr ähnliche Verläufe mit Maxima in der Nacht und Minima am Morgen oder Vormittag aufweisen. Zwischen den Genexpressionen von *hBmal1* und *hSod1* bestanden zahlreiche – teils sehr – signifikante Zusammenhänge zwischen den einzelnen Messzeitpunkten. Dies stützt die Annahme, dass BMAL1 als Transkriptionsfaktor die circadiane Synthese von *hSod1*-mRNA beeinflusst.

Der OS nimmt in beiden Altersgruppen im Tagesverlauf signifikant ab ($p < 0,001$) und zeigt somit ebenfalls eine circadiane Rhythmik. Bei älteren Menschen war der OS zu jedem

Zeitpunkt signifikant höher ($p < 0,050$), was die Ergebnisse vorheriger Studien bestätigt. Von 08-20 Uhr nahmen OS und SOD1-Proteinkonzentration simultan ab, wobei in keiner Altersgruppe ein signifikanter Zusammenhang zwischen OS und SOD1 bestand. Sport war bei älteren Frauen signifikant negativ mit der Konzentration freier Radikale im Speichel korreliert, sodass regelmäßige Bewegung im Alter möglicherweise dem Anstieg an OS entgegenwirkt. Andere Lebensstilparameter scheinen eine untergeordnete Rolle für den OS zu spielen, da der Konsum von Alkohol und Kaffee sowie Obst- und Gemüseverzehr ebenso wenig signifikante Zusammenhänge mit dem OS zeigten wie der subjektiv empfundene Stress oder die Lebenszufriedenheit.

ABSTRACT

Life expectancy is rising continuously, making healthy ageing a prevailing topic of research. The increasing oxidative stress (OS), that damages proteins, lipids and genome, is seen as a main factor for ageing. Free antioxidants like melatonin and antioxidative enzymes like superoxide dismutase 1 (SOD1) counteract OS. Melatonin as well as SOD1 show circadian rhythmicity. The clock gene *hBmal1* is part of the circadian regulation of clock controlled genes. Mice lacking the *mBmal1* gene showed premature ageing, that might be related to a decreased expression of SOD1. This study aimed to analyze if there are relations between the clock gene *hBmal1* and the gene for SOD1 in younger and older woman. Moreover, relations between SOD1-protein, OS, melatonin and lifestyle parameters were examined.

21 young (23.7 ± 2.3 years) and 21 older (66.8 ± 5.7 years) healthy women have been studied. Buccal mucosa cells (MSH) and saliva were collected at six time-points (08, 12, 16, 20, 24, 04 o'clock) over one day. mRNA and proteins were isolated from MSH for quantitative analysis of gene expression (*hBmal1* and *hSod1*) and protein synthesis (SOD1). Quantitative analysis was based on real time polymerase chain reaction and immunoblotting with attached densitometry. Concentrations of OS and melatonin were analyzed from saliva via enzyme immunosorbent assay (ELISA). Furthermore, body temperature and anthropometric characters have been measured, while questionnaires asked aspects concerning lifestyle parameters.

This study showed that mRNA concentrations for *hBmal1* and *hSod1* have very similar circadian rhythms with maxima in the night and minima at the morning or midday. Gen expressions of *hBmal1* and *hSod1* were highly correlated with each other most of the time. This finding supports the hypothesis that BMAL1 as transcription factor regulates the circadian synthesis of *hSod1*-mRNA.

In both age groups, mean OS decreased significantly during the day ($p < 0.010$), showing circadian rhythmicity. Older women showed significantly higher OS levels at all time-points than younger subjects ($p < 0.050$). Although OS and SOD1 declined simultaneously during the active phase between 08:00 and 20:00 o'clock, there was no significant correlation between the enzyme and OS in any group. There were significant negative correlations between OS

concentrations and sports in older women, suggesting that regularly exercises may counteract free radicals in higher age. Other lifestyle parameters did not show any notably effect on the OS level, for example consumption of alcohol, coffee, vegetables and fruits as well as subjective stress and life satisfaction were not correlated with OS.

1 EINLEITUNG

1.1 CHRONOBIOLOGIE

Die Chronobiologie (vom lateinischen *chronos* = Zeit) befasst sich mit der zeitlichen Organisation von physiologischen Prozessen und wiederkehrenden Verhaltensmustern bei Organismen. Sie beschreibt rhythmische Verhaltensweisen von Eukaryoten im Tages- und Jahresverlauf (Pevet 2000). Neben den circadianen Rhythmen, die im folgenden Absatz näher behandelt werden, und den circannularen Rhythmen (Jahresrhythmen), spielen circatidale (Gezeiten-abhängige) und circalunare (Mond-abhängige) Rhythmen wichtige Rollen im Tierreich (Haen u. Zulley 1994, Müller *et al.* 2019). Circaannulare Rhythmen werden bei Fortpflanzung, Wanderbewegungen oder Winterschlaf beobachtet (Pevet 2000). Diese gehen häufig einher mit physiologischen und hormonellen Veränderungen, die mit Außenfaktoren wie der Tageslänge verknüpft sind (Pevet 2000).

Solche periodischen Schwankungen gehören zu den charakteristischen Eigenschaften aller Organismen vom Einzeller bis zum Primaten (Dunlap 1993). Biologische Rhythmen sind bei allen Eukaryoten bekannt und wurden erstmals durch den französischen Astronom Jean Jacques d'Ortois de Mairan im Jahr 1729 beschrieben, der die täglichen Blattbewegungen von Mimosen beobachtete und feststellte, dass diese Bewegungen auch bei anhaltender Dunkelheit erhalten bleiben. Zur Beschreibung solch oszillierender Rhythmen werden Rhythmus-Parameter einer Cosinor-Analyse herangezogen. Empirisch ermittelte Daten bilden die Grundlage für eine Cosinusfunktion, aus der die Parameter abgeleitet werden (Refinetti u. Menaker 1992). Zu den beschreibenden Rhythmus-Parametern gehören Mesor, Amplitude, Periode und Akrophase. Der Mesor (*midline estimating statistic of rhythm*) beschreibt den mittleren Wert der angepassten Cosinus-Funktion und ist somit der zentrale Wert, um den die oszillierende Variable schwingt (Abb. 1). Die Amplitude ist definiert als halbe Schwingungsbreite der Cosinusfunktion und beschreibt die halbe Differenz zwischen dem Minimum (= Nadir) und dem Maximum (= Peak) (Abb. 1). Als Periode wird die Dauer einer gesamten Schwingung, also der Abstand zwischen zwei sich zeitlich entsprechenden Punkten (z. B. Peaks), bezeichnet (Abb. 1). Die Akrophase beschreibt die zeitliche Lage des Maximums

der angepassten Funktion in Bezug auf einen Referenzpunkt (Abb. 1). Dieser liegt bei tagaktiven Lebewesen wie dem Menschen nach internationaler Übereinkunft um 24:00 Uhr.

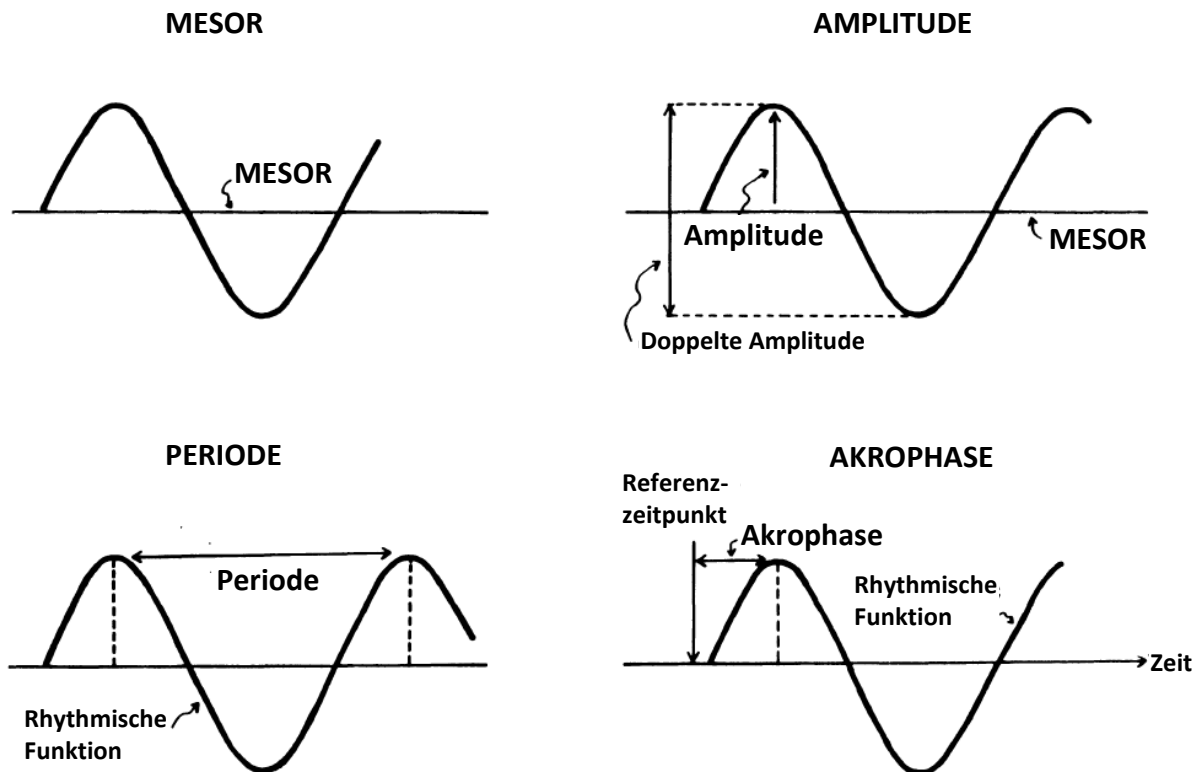


ABB. 1: MESOR, AMPLITUDE, PERIODE UND AKROPHASE (VERÄNDERT NACH HAUS U. TOUITOU 1992)

1.2 CIRCADIANE RHYTHMEN

Der Begriff der circadianen Rhythmik wurde 1959 von Halberg *et al.* eingeführt und beschreibt den bei Bakterien und Eukaryoten anzutreffenden physiologischen Zyklus von etwa 24 Stunden Dauer, der auch bei Abwesenheit äußerer Zeitgeber fortbesteht (Müller *et al.* 2019). Circadiane Rhythmik (vom lateinischen *circa* = ungefähr, *dies* = Tag) bezeichnet den periodischen Ablauf eines annäherungsweise 24-stündigen Rhythmus. Die Länge eines circadianen Rhythmus dauert somit etwa einen Tag, wobei die „frei laufenden“ Perioden ohne externe Zeitstimuli von 16 bis 32 Stunden variieren (Refinetti u. Menaker 1992).

Alle eukaryotischen Organismen verfügen über eine innere Uhr, mit der sie biologische Prozesse zyklisch steuern. Circadiane Rhythmen finden sich folglich in den verschiedensten Organisationsformen des Lebens. Im Pflanzenreich sind sie beispielsweise bei den

Schlafbewegungen der Bohnenblätter sowie bei der Öffnung der Stomatazellen zu beobachten (Bünning 1977; Brinker 2002). Auch wenn die Pflanze dauerhaft im Dunkeln steht, öffnet sie nachts die Stomatazellen zur Aufnahme von Kohlenstoffdioxid. Zum Tag schließen sich die Zellen, um Wasserverluste zu verringern (Mohr u. Schopfer 2013).

Circadiane Rhythmen werden durch starke endogene Parameter gesteuert und die Rhythmik endogen generiert. Diese Rhythmik wird als die innere Uhr eines Organismus bezeichnet. Die innere Uhr generiert selbsterhaltende und zellautonome Oszillationen mit einer Dauer von etwa 24 Stunden. Der endogene Rhythmus stimmt nicht vollkommen mit dem Außenzyklus des 24-Stunden Tages überein. Deshalb wird die innere Uhr über exogene zyklische Umweltfaktoren, sogenannte Zeitgeber, mit dem 24-Stunden Tag synchronisiert. Dabei ist das Licht und der damit einhergehende tägliche Hell-Dunkel-Wechsel – die Photoperiode – der wichtigste exogene Zeitgeber. Ohne exogene Zeitgeber sind die „frei laufenden“ Rhythmen geringfügig kürzer oder länger als der 24-Stunden Tag. Der circadiane Rhythmus bleibt folglich erhalten, verschiebt sich jedoch ohne externe Stimuli gegenüber dem chronometrischen Tagesverlauf mit exakt 24 Stunden.

1.3 CIRCADIANE UHR DES MENSCHEN

Der circadiane Rhythmus des Menschen wurde im Experiment von Aschoff in den 1960er Jahren untersucht, bei dem sich freiwillige Versuchspersonen mehrere Wochen ohne externe Zeitgeber (z. B. Licht, Uhren, etc.) in unterirdischen Räumen aufhielten (Aschoff 1965). Ihren Tagesablauf durften die Personen frei gestalten. Der unter diesen Bedingungen festgestellte Schlaf-Wach-Rhythmus des Probandenkollektivs hatte eine mittlere Periodenlänge von 25 Stunden (Aschoff 1965), wobei es ausgeprägte interindividuelle Unterschiede gab. Unter natürlichen Umständen synchronisieren Menschen ihren Aktivitätsrhythmus wie andere Lebewesen mithilfe von externen Zeitgebern wie dem Sonnenlicht mit dem 24-Stunden Tag. In Abwesenheit jeglicher Zeitsignale aus der Umwelt bleibt der Rhythmus der verschiedenen Körperfunktionen erhalten, jedoch nimmt die zeitliche Dauer der Periode bei „frei laufenden“ Rhythmen zu. Der Rhythmus der inneren Uhr wird somit endogen erzeugt (Korf u. Stehle 2005).

Im Tagesverlauf schwanken beim Menschen unter anderem Puls, Blutdruck, Körpertemperatur, Zellteilungsrate, Blutzellenzahl, Zusammensetzung des Urins, Stoffwechsel, Reaktionen auf Medikamente sowie Aufmerksamkeit (Aschoff 1955; Hastings 1997; Korf u.

Stehle 2005). Auch etliche Hormone weisen tageszyklische Rhythmen auf. Beispiele dafür sind Cortisol aus der Nebennierenrinde, das *Thyreoida*-stimulierende Hormon (TSH) aus dem Hypophysenvorderlappen sowie Melatonin aus der Epiphyse (Korf u. Stehle 2005). Aus den circadianen Rhythmen des Stoffwechsels resultiert eine tageszeitabhängige Wirkung von Medikamenten (Korf u. Stehle 2005).

Bei Menschen wird zwischen verschiedenen Chronotypen unterschieden, die in Abhängigkeit von ihrer Morgen- und Abendpräferenz in Morgen-, Neutral- und Abendtypen eingeteilt werden (Horne u. Östberg 1976; Roenneberg 2012). Im Vergleich zu Abendtypen haben Morgentypen eine frühere Phasenlage, wodurch sie früher aufstehen und früher zu Bett gehen. Im Gegensatz zu Abendtypen können sie spätes ins-Bett-gehen nicht durch längeres Schlafen am Morgen kompensieren. Durch die frühere Phasenlage erreichen Morgentypen den Peak und den Nadir ihrer Leistung sowie physiologische Rhythmen deutlich vor den Abendtypen (Dijk *et al.* 1999; Foret *et al.* 1982; Kerkhof u. van Dongen 1996).

1.4 DER ZENTRALE CIRCADIANE SCHRITTMACHER – NUCLEUS SUPRACHIASMATICUS

Der zentrale circadiane Schrittmacher der Säugetiere ist in paarigen, bilateral angeordneten Ansammlungen von Nervenzellen im Hypothalamus über der Sehnervenkreuzung lokalisiert und wird als Nucleus suprachiasmaticus (SCN) bezeichnet. In Abhängigkeit nach den sekretierten Neurotransmittern werden die Nuclei in Zentrum (engl. *core*) und Schale (engl. *shell*) unterteilt (Moore *et al.* 2002). Aufgabe des SCN ist einerseits die Generierung der circadianen Rhythmik und die Synchronisation aller peripheren Oszillatoren in den Zellen andererseits. Der wichtigste exogene Zeitgeber zur Synchronisation mit der Tageslänge ist das Licht, welches über die Netzhaut und die Pigmentzellen der Augen detektiert wird. Die bei Säugetieren hierfür verantwortlichen Photorezeptoren sind spezielle Lichtsinneszellen, die intrinsischen photosensitiven retinalen Ganglionzellen (ipRGCs) (Berson *et al.* 2002). Diese Zellen dienen ausschließlich der Zeitwahrnehmung (Bellingham u. Foster 2002) und detektieren Licht mit dem Photopigment Melanopsin (Provencio *et al.* 1998; Provencio *et al.* 2000). Besonders sensitiv sind die ipRGCs für Licht der Wellenlänge um 460 nm, dem sogenannten Blaulicht (Brainard *et al.* 2001; Thapan *et al.* 2001). Von der Retina gelangt die Information über den Lichtzustand durch den retinohypothalamischen Trakt (RHT) in den SCN. Dazu schüttet der RHT, der direkt den lichtsensitiven Ganglionzellen der Retina entspringt, die Botenstoffe Glutamat und ein Neuropeptid aus. Der SCN von Säugern vermittelt

Zeitinformationen mittels elektrischer, endokriner und metabolischer Signale weiter. Zu den wichtigen neuroendokrinen Ausgangssignalen gehört die rhythmische Freisetzung von Vasopressin (Reppert *et al.* 1987). Über Verbindungen zwischen dem SCN und dem autonomen Nervensystem, kann der zentrale Oszillator zahlreiche Organe und Funktionen in der Peripherie steuern. Solche Verbindungen zum SCN sind beispielsweise für das endokrine Pankreas und die Nebennierenrinde (Kalsbeek u. Buijs 2002) sowie für die Epiphyse bekannt. Darüber hinaus enthalten eine Vielzahl einzelner Zellen individuelle circadiane Uhren (Balsalobre *et al.* 1998), die alle miteinander synchronisiert werden müssen. Nicht-visuelle Umweltreize, die die innere Uhr beeinflussen sind z. B. Nahrungsaufnahme, Temperatur und soziale Interaktionen (Carneiro u. Araujo 2012; Bloch *et al.* 2013; Palma-Anzures *et al.* 2012).

1.5 UHRENGENE UND DIE MOLEKULARE RÜCKKOPPLUNGSSCHLEIFE

Auf molekularer Ebene ermöglichen Uhrengene die circadiane Rhythmogenese. Sie werden im Tagesverlauf zyklisch transkribiert, translatiert und die Translationsprodukte wieder abgebaut. Ihre Translationsprodukte können als aktivierende oder hemmende Transkriptionsfaktoren (TF) die Expression von Zielgenen an- oder abschalten. Viele Uhrengene sind stammesgeschichtlich bereits sehr alt, sind hochkonserviert und kommen bereits bei den einfachsten einzelligen Lebewesen vor (Dunlap *et al.* 2004). Die innere Uhr ist somit im Erbgut verankert und infolgedessen ist die Periodenlänge des circadianen Rhythmus innerhalb einer Tierart sehr konstant.

Die molekulare Basis der Rhythmogenese beruht auf transkriptionalen und translationalen Rückkopplungsschleifen, in denen Uhrengene und die von ihnen kodierten TF miteinander agieren (Review Ko u. Takahashi 2006) (Abb. 2). Der zentrale Mechanismus besteht aus einer negativen Rückkopplungsschleife, in der die Uhrengene *Bmal1* und *Clock* für die aktivierenden *basic-helix-loop-helix*-TF BMAL1 und CLOCK kodieren. Während *Clock* konstant exprimiert wird, ist die Expression von *Bmal1* rhythmisch und unterliegt einer circadianen Kontrolle (Maywood *et al.* 2003). Das humane Gen *hBmal1* liegt auf Chromosom 11 (11q15). Die Proteinmoleküle BMAL1 und CLOCK lagern sich zu einem Heterodimer zusammen, das in den Zellkern transloziert wird, wo es an eine E-Box binden kann. E-Boxen befinden sich in Promotoregionen von Uhrengen und Uhrengen-kontrollierten Genen. Die Bindung des CLOCK/BMAL1-Dimers an eine E-Box induziert die Transkription der Uhrengene *Period (Per) 1,2*, *Cryptochrome (Cry) 1,2* und *nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1 (Rev-Erba)*,

die ihrerseits hemmende Faktoren kodieren (Review Ko u. Takahashi 2006). Diese bilden ebenfalls Heterodimere wie z. B. PER1/CRY1, die als TF in den Zellkern transloziert werden und dort die aktivierende Wirkung von CLOCK/BMAL1 unterdrücken (Review Korf u. Stehle 2005). Die Bildung der Heterodimere wird mittels Proteinphosphorylierung durch die Caseinkinase 1 ϵ / δ kontrolliert. So wird z. B. PER1 nach der Phosphorylierung unmittelbar durch proteasomale Proteolyse abgebaut (Reppert u. Weaver 2002). Durch die Zusammenlagerung von PER- und CRY-Proteinen wird die Ubiquitylierung von CRY-Proteinen und der damit verbundene proteasomale Abbau verhindert (Okamura *et al.* 2002). Kinasen und Phosphatasen regulieren Geschwindigkeit und Präzision der inneren Uhr mittels Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Zielstrukturen (Review Ko u. Takahashi 2006). Die negative Rückkopplungsschleife aus den Elementen CLOCK/BMAL1 und CRY/PER bildet den zentralen Mechanismus der Rhythmogenese. Dieser wird durch weitere Schleifen ergänzt, an denen sogenannte *Proline and Acidic amino acid-Rich* (PAR)-Proteine, wie zum Beispiel *Hepatic Leucocyte Factor* (HLF), *Thyrotrophic Embryonic Factor* (TEF) und *Albumin D-site-binding* Protein (DBP) beteiligt sind (Okamura *et al.* 2002). Der TF REV-ERB α beeinflusst die Transkription von *Bmal1*.

Den molekularen Ausgang der Rhythmogenese bilden Uhren-gen-kontrollierte Gene (CCGs), die ebenfalls eine E-Box in ihren Promotorregionen besitzen. Ihre Transkription wird durch CLOCK/BMAL1 aktiviert und durch PER und CRY inhibiert (Jin *et al.* 1999). Das Vasopressin-gen besitzt im Promotor eine E-Box und wird somit den Uhren-gen-kontrollierten Genen zugeordnet. Mehrere 100 Gene in den Organen der Peripherie zeigen rhythmische Expressionsmuster und gehören zu den Uhren-gen-kontrollierten Genen (Hastings *et al.* 2003). Auch die Uhren-gene selbst werden nicht nur im zentralen Oszillator der inneren Uhr – dem SCN – rhythmisch exprimiert, sondern auch in zahlreichen anderen Geweben wie z. B. in der Epiphyse, im Hippocampus, in der Nebennierenrinde und im endokrinen Pankreas. In diesen peripheren Oszillatoren wird die rhythmische Genexpression, anders als im SCN, nicht endogen erzeugt, sondern benötigt einen wiederkehrenden Stimulus vom zentralen Schrittmacher. Komplexe Interaktionen ermöglichen die Synchronisation zwischen dem SCN, Lichtrezeptoren, neuroendokrinen und endokrinen Zentren sowie dem autonomen Nervensystem. Die Synchronisation verschiedener Körperfunktionen untereinander und mit

dem natürlichen Rhythmus der Umwelt ist eine wichtige Voraussetzung für Gesundheit und Wohlbefinden.

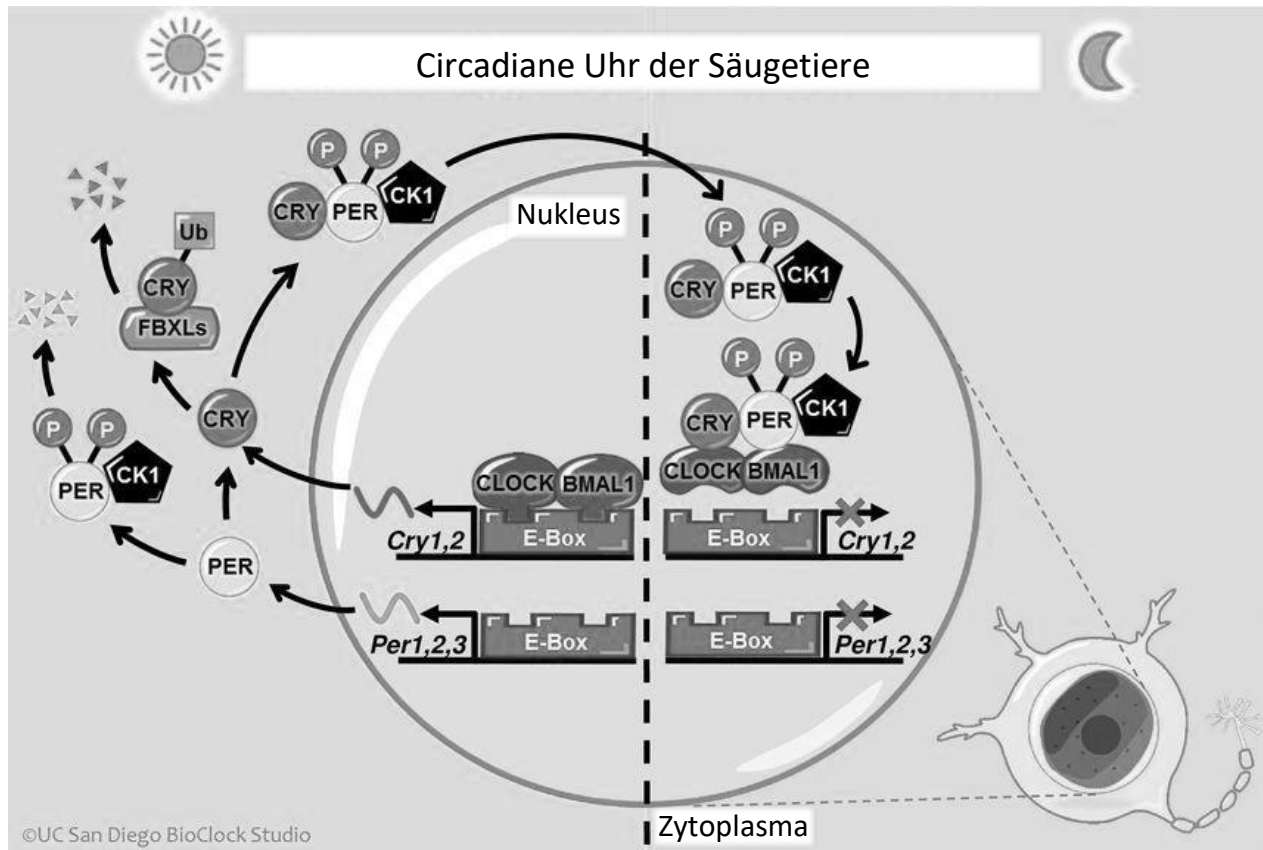


ABB. 2: MOLEKULARE RÜCKKOPPLUNGSSCHLEIFE DER INNEREN UHR BEI SÄUGETIEREN (VERÄNDERT NACH URL 1)

Bmal1, *Clock*, *Cry* und *Per* = Uhrengene der zentralen Rückkopplungsschleife,
 CK1 = Caseinkinase 1, E-Box = Enhancer Box, P = phosphoryliert, Ub = ubiquitinyliert,
 FBXLs = F-Box und *Leucine Rich Repeat Proteins*

1.6 MELATONIN

1.6.1 AUFGABE UND WIRKUNG

Das Neurohormon Melatonin dient als wichtige Zeitinformation der Peripherie und wird auch als „Nachthormon“ bezeichnet, weil es der inneren Uhr ein Signal für Dunkelheit vermittelt. Die Länge der täglichen Melatoninsynthese ist dabei ein Maß für die Länge der Dunkelperiode und bildet somit die jahreszeitlichen Unterschiede der Lichterhältnisse ab. Dadurch vermittelt Melatonin circadiane und circannuale Variationen in Metabolismus und Reproduktion in allen photosensitiven Spezies (Barrett u. Bolborea 2012).

Melatonin wirkt über Rezeptor-unabhängige und Rezeptor-vermittelte Signalwege. Bei letzterem bindet Melatonin an hochaffine spezifische Melatoninrezeptoren (Ebisawa *et al.* 1994). Säugetiere verfügen über zwei unterschiedliche Rezeptoren, MT1- und MT2-Rezeptoren, die jeweils G-Protein-gekoppelte Signalkaskaden aktivieren. Melatoninrezeptoren finden sich in hoher Dichte im SCN, in der Retina, teilweise in der Hypophyse (Gall *et al.* 2002b) sowie in peripheren Organen wie dem endokrinen Pankreas (Peschke *et al.* 2000). Bindet Melatonin an die Rezeptoren im SCN, so entsteht eine Rückkopplungsschleife im circadianen System, die zu bestimmten Zeitpunkten eine Phasenverschiebung der circadianen Rhythmik bewirkt (Khalsa *et al.* 2003). Die Melatonin-information im SCN dient der Synchronisation des circadianen Rhythmus mit dem exogenen Tag-Nacht-Rhythmus (Mutoh *et al.* 2003). Durch seine Signalwirkung im SCN kann Melatonin direkt die Expression von Uhrengenen beeinflussen. So reguliert Melatonin in der Hypophyse von Mäusen und Ratten beispielsweise die Expressionen von *Cry* und *Per1* (Dardente *et al.* 2003; Gall *et al.* 2002a).

Neben seiner Rolle innerhalb der circadianen Rhythmussteuerung ist Melatonin ein wichtiges Antioxidans (Fanjul-Moles u. López-Riquelme 2016), das insbesondere in den Mitochondrien als freier Radikalfänger aktiv ist (Reiter *et al.* 2014). Hierzu ermöglicht Melatonin Elektron- und Wasserstofftransfer (Galano *et al.* 2011). Darüber hinaus induziert es die Synthese zahlreicher antioxidativer Enzyme wie die Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase (Rodriguez *et al.* 2004). Des Weiteren steigert Melatonin die Immunantwort, hat antiinflammatorische Eigenschaften, reduziert die Stressantwort, erhält die Homöostase in den Mitochondrien und inhibiert die Krebsentwicklung (Galano *et al.* 2011).

Gegenspieler des Melatonins könnte Cortisol sein, das ebenfalls zyklisch produziert wird, jedoch am Morgen nach dem Aufwachen das Konzentrationsmaximum erreicht und im Zuge der Stressantwort vermehrt sekretiert wird. Cortisol supprimiert die Immunantwort, während Melatonin diese verstärkt (Carrillo-Vico *et al.* 2005; Scherholz *et al.* 2019).

1.6.2 SYNTHESE

Die Synthese des Indolamins Melatonin (*N*-Acetyl-5-Methoxytryptamin) ist die wichtigste Aufgabe der Epiphyse. Spezifische Zellen der Epiphyse, die Pinealozyten, sind für die Abgabe des Neurohormons in die Blutbahn verantwortlich (Berra u. Rizzo 2009; Pandi-Perumal *et al.* 2008). Die Melatoninsynthese in der Epiphyse wird durch eine direkte Verbindung mit dem

SCN gesteuert (Gall *et al.* 2005). Zu Beginn der Nacht setzen die sympathischen Nervenendigungen der Epiphyse große Mengen des Neurotransmitters Noradrenalin frei (Drijfhout *et al.* 1996). Noradrenalin bindet an α_1 - und β_1 -adrenerge Rezeptoren in der Zellmembran von Pinealozyten. Die Stimulation letzterer ist entscheidend für die nächtliche Melatoninsynthese und setzt eine G-Protein-gekoppelte Signalkaskade in Gang. Die Aktivierung des G-Proteins und der Adenylatzyklase führt zu einer zehnfachen Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Die Reizung der α_1 -Rezeptoren führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration (Schomerus *et al.* 1995) und hat alleine keinen direkten Einfluss auf die Melatoninsynthese. Bei gleichzeitiger Reizung der α_1 - und β_1 -adrenergen Rezeptoren kommt es hingegen zu einer potenzierten Bildung von cAMP und infolgedessen zu einer potenzierten Melatoninsynthese. Die Melatoninbiosynthese beginnt mit der Aufnahme von Tryptophan aus der Blutbahn in die Pinealozyten. Die Tryptophanhydroxylase hydroxyliert die Aminosäure am 5'-Ende zu 5-Hydroxytryptophan. Aus diesem entsteht durch Decarboxylierung Serotonin, welches durch die Arylalkylamin-*N*-acetyltransferase (AANAT) zu *N*-Acetylserotonin umgewandelt wird. Die Hydroxyindol-*O*-methyltransferase wandelt *N*-Acetylserotonin in Melatonin um (Abb. 3). Das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Melatoninbiosynthese ist die ANAAT, die sowohl die Bildung als auch die Abgabe in die Blutbahn reguliert. Die Regulation erfolgt über drei Ebenen: 1. transkriptionale Steuerung der Expression des *Aanat*-Gens, 2. posttranskriptionale Steuerung des AANAT-Proteingehalts z. B. durch kontrollierte Proteolyse, 3. Steuerung der Enzymaktivität durch Phosphorylierung und Protein-Protein-Interaktionen. Bei Primaten spielen nur die Punkte 2 (Schomerus *et al.* 2000) und 3 (Stehle *et al.* 2001) eine Rolle für die Regulation der AANAT. Synthetisiertes Melatonin wird nicht in den Pinealozyten gespeichert, sondern diffundiert umgehend in die Kapillare und die Cerebrospinalflüssigkeit (Berra u. Rizzo 2009). Melatonin wird überwiegend in der Epiphyse gebildet, jedoch auch in diversen extrapinealen Organen wie Retina, Zerebellum, Haut, Ovarien, Leber, Pankreas, Nieren und weiteren (Review Galano *et al.* 2011). Die biologische Halbwertszeit von Melatonin liegt im Serum zwischen 30 und 52 min (Lane u. Moss 1985; Vakkuri *et al.* 1985; Waldhauser *et al.* 1984; Aldhous *et al.* 1985).

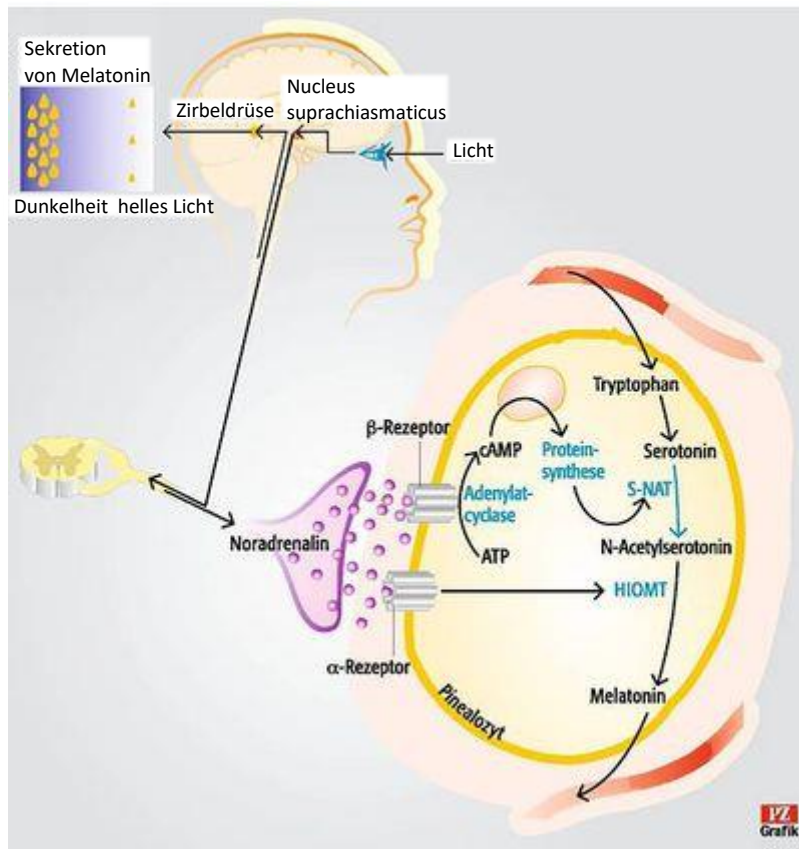


ABB. 3: MELATONINSYNTHESE UND –SIGNALWEG (VERÄNDERT NACH URL 2)

1.6.3 CIRCADIANE RHYTHMIK UND EINFLUSSFAKTOREN

Die Melatoninsynthese und -konzentration unterliegen einer circadianen Kontrolle und zeigen eine ausgeprägte circadiane Rhythmik. Der Konzentrationspeak liegt in der Nacht zwischen 24 und 04 Uhr und das Minimum am Tag (Benloucif *et al.* 2008; Brzezinski 1997). Die Rhythmik wird dabei über die Hell-Dunkel-Verhältnisse gesteuert: Blaulicht verhindert die Melatoninsynthese, sodass die Einwirkung von Blaulicht am Abend zu einer verzögerten Melatoninsynthese und folglich erschwertem Einschlafen führen kann (Lewy *et al.* 1980; Chang *et al.* 2015). Eine veränderte Melatoninrhythmik kann Störungen im Schlaf-Wach-Rhythmus mit sich bringen (Olbrich u. Dittmar 2011).

Die Melatoninkonzentration kann durch eine Vielzahl an Einflussfaktoren verändert werden. Dazu gehört primär das Blaulicht, welches die Melatoninsynthese unterbindet, ferner Medikamente wie β -Blocker sowie die Aufnahme von Melatonin über die Nahrung. Sehr hohe Melatoninkonzentrationen enthalten Nahrungsmittel wie Kaffee (Ramakrishna *et al.* 2012), Walnüsse (Reiter *et al.* 2005), Bananen und dunkle Schokolade, aber auch viele andere

Früchte, Gemüsesorten und Nüsse sind melatoninhaltig (Dubbels *et al.* 1995; Paredes *et al.* 2009; Murch *et al.* 2010; Iriti *et al.* 2010; Hattori *et al.* 1995).

Im humanen Melatoninrhythmus wurden neben tageszeitlichen auch saisonale Veränderungen mit einer früheren Phasenlage im Sommer entdeckt (Broadway *et al.* 1987). Zudem verändert sich die Melatoninrhythmik mit dem Lebenszyklus: Als Fötus und vor dem 3. Monat erhält der Mensch den Melatoninrhythmus über die Plazenta oder durch die Muttermilch (Waddell *et al.* 2012). Ab dem 3. Lebensmonat bildet sich der körpereigene Melatoninrhythmus aus, wobei die Melatoninmenge bis zur Pubertät ansteigt (Payne 2006). Bei jungen Erwachsenen ist die Melatoninkonzentration stabil. Erst ab 60 Jahren beginnt er wieder zu sinken (Sharma *et al.* 1989). Mit der Abnahme der Melatoninsynthese im Alter nehmen auch die durch Melatonin vermittelten Funktionen ab. Infolgedessen kann es zu Schlafstörungen bei älteren Menschen kommen (Savaskan *et al.* 2005).

Melatonin zeigt sowohl im Blut als auch im Speichel eine ausgeprägte circadiane Rhythmik (Abb. 4 und Reiter *et al.* 2014). In den Zellen der Mundhöhle wirkt Melatonin sowohl Rezeptor-vermittelt als auch Rezeptor-unabhängig (Cutando *et al.* 2011; Reiter *et al.* 2015). In den Speichel gelangt Melatonin über die Azinuszellen der großen Speicheldrüsen sowie über gingivale Sulkusflüssigkeit (Srinath *et al.* 2010). Hauptaufgaben des Melatonins in der Mundhöhle sind antientzündliche und antioxidative Funktionen. Im Speichel ist die Melatoninkonzentration geringer ausgeprägt als im Blut und beträgt etwa 1/4 bis 1/3 der Blutkonzentration (Laakso *et al.* 1990; Voultios *et al.* 1997). Intraindividuelle Melatoninprofile sind in der Regel sowohl in Bezug auf die Zeit als auch auf die Amplitude sehr stabil (Benloucif *et al.* 2008). Im Gegensatz dazu gibt es große interindividuelle Unterschiede in der Menge an synthetisiertem Melatonin (Benloucif *et al.* 2008).

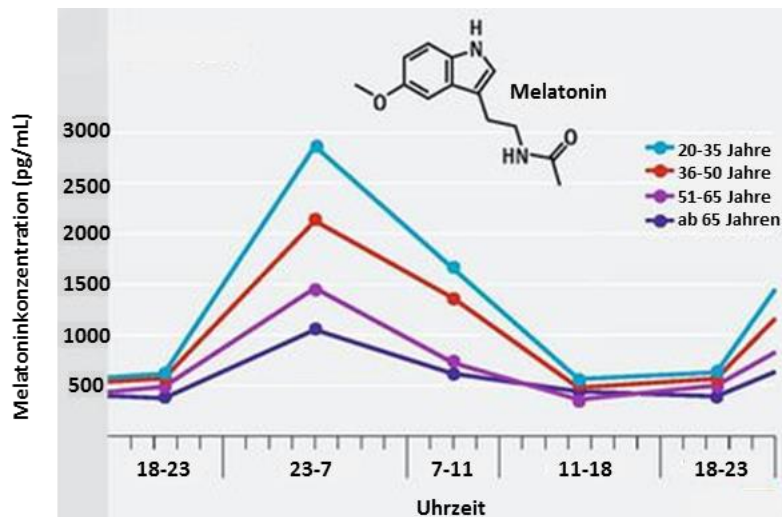


ABB. 4: MELATONINMOLEKÜL, TAGESZEITLICHE RHYTHMIK UND VERÄNDERUNGEN MIT DEM ALTER (VERÄNDERT NACH URL 3)

1.7 FREIE RADIKALE, OXIDATIVER STRESS UND ANTIOXIDATIVE SYSTEME

1.7.1 ENTSTEHUNG VON FREIEN RADIKALEN

Freie Radikale sind Moleküle oder Molekülfragmente mit einem oder mehr ungepaarten Elektronen in der Valenzschale (Cheeseman u. Slater 1993). Aufgrund der ungepaarten Elektronen, die Elektronen aus anderen Verbindungen anziehen und diese oxidieren, sind freie Radikale häufig instabil und hochreaktiv. Innerhalb der freien Radikale gibt es verschiedene chemische Gruppen wie die Sauerstoffradikale (ROS, engl.: *reactive oxygen species*), Stickstoffradikale (RNS, engl.: *reactive nitrogen species*) und Schwefelradikale (RSS, engl.: *reactive sulphur species*) (Finaud *et al.* 2006). ROS können verschiedenste chemische Verbindungen sein, die teilweise den freien Radikalen zugeordnet werden: angeregter Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), Superoxidanion (O_2^-), Hydroxylradikal ($\text{HO}\bullet$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroperoxyl-Radikal ($\text{HOO}\bullet$), Alkoxyradikal ($\text{RO}\bullet$) und Peroxylradikal ($\text{ROO}\bullet$) sind einige häufig vorkommende Beispiele, von denen nicht alle ungepaarte Elektronen aufweisen und somit nur der Gruppe der ROS, nicht aber den freien Radikalen zugeordnet werden. Einige der genannten Radikale, wie Superoxid oder Hydroxylradikal, sind extrem instabil, während andere wie Wasserstoffperoxid verhältnismäßig langlebig sind.

Aerobe Organismen benötigen molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor während der Oxidation energiereicher Substrate, d. h. der Adenosintriphosphat(ATP)-Synthese. Paradoxerweise stellt Sauerstoff zugleich eine permanente Bedrohung für alle Zellstrukturen dar. Durch

exogene und endogene Quellen kommt es kontinuierlich zur Bildung von ROS (Cheeseman u. Slater 1993). Zu den exogenen Umweltquellen gehören ionisierende Strahlung, Ozon, Luftverschmutzung, Pestizide, Schwermetalle, Rauch und Alkohol. Endogen produzierte ROS entstehen während der Aktivierung von Immunzellen, Infektionen, Entzündungen, Krebserkrankungen, mangelnder Durchblutung, mentalem oder physischem Stress, starker körperlicher Belastung durch Sport und das Altern (Cooper *et al.* 2002; Davies 1995; Mezzetti *et al.* 1996; Pacifici u. Davies 1991; Stohs 1995). Zellen produzieren fortwährend freie Sauerstoffradikale im Zuge von lebenserhaltenden, enzymkatalysierten Stoffwechselprozessen wie der aeroben Atmungskette (Cheeseman u. Slater 1993) oder in Stressantworten auf schädliche biotische oder abiotische Stressfaktoren wie Sauerstoffmangel. Zu den ROS, die durch Metabolismus entstehen, gehören auch solche, die durch die Nahrungsaufnahme und durch physische Anstrengungen wie starken Sport (Cooper *et al.* 2002) entstehen. Während starker Sport den OS erhöht, wirkt moderate Bewegung antioxidativ (Gomez-Cabrera *et al.* 2008).

Eine Vielzahl an Radikalen entsteht durch exogene, chemische oder physikalische Stressfaktoren oder durch zellabhängige Mechanismen wie zytosolische Enzyme oder mitochondriale Mechanismen (Pacifici u. Davies 1991). In vielen Kompartimenten werden von verschiedenen Enzymen freie Sauerstoffradikale produziert. Hierzu gehören Proteine der Plasmamembran wie NADPH Oxidasen (Lambeth 2004), der Lipidmetabolismus in Peroxisomen sowie die Aktivität verschiedener cytosolischer Enzyme wie den Cyclooxygenasen. Die überwältigende Mehrheit von über 90 % der zellulären ROS entstammt jedoch den Mitochondrien und entsteht in der Atmungskette (Turrens 2003). Mitochondriale ROS sind ein Nebenprodukt der oxidativen Phosphorylierung an der inneren Mitochondrienmembran, bei der NADH und FADH kontrolliert oxidiert werden und Energie gewonnen wird. Die mitochondrialen Superoxidradikale entstehen dabei überwiegend in der Elektronentransportkette, genauer in den Komplexen I (NADH Dehydrogenase) und III (Ubiquinon-Cytochrom C Reduktase) (Turrens 1997). Von dem molekularen Sauerstoff reagieren 1-5 % zu $O_2^{\cdot-}$ (Lenaz 1998).

Die Menge an freien Sauerstoffradikalen repräsentiert das Verhältnis von ROS-Entstehung und -Eliminierung durch Antioxidantien und antioxidative Enzyme. Veränderungen der

Konzentration von ROS können somit immer eine Folge von gesteigerter ROS-Produktion oder verringerter -Eliminierung sein (Balaban *et al.* 2005).

1.7.2 WIRKUNGEN VON FREIEN RADIKALEN, OXIDATIVER STRESS UND ANTIOXIDATIVE SYSTEME

Intrazelluläre ROS und RNS führen zu oxidativem Stress (OS). Sie schädigen Zellstrukturen wie DNA, Proteine und Lipide und induzieren den programmierten Zelltod, die Apoptose (Duracková 2010). Die Auswirkungen von OS sind abhängig vom Maß der Schäden und der zellulären Antwort auf die Schäden. Wenn die Zelle die schädlichen Veränderungen nicht reparieren und ihre Funktionalität nicht in vollem Umfang wiedererlangen kann, kann es zum Zelltod kommen. Durch freie Sauerstoffradikale induzierter OS ist mit unzähligen Krankheiten wie Krebs, Arteriosklerose, rheumatische Arthritis, chronische Entzündungserkrankungen des gastrointestinalen Traktes, Katarakt, Diabetes, Parkinson und Alzheimer sowie mit dem Altern assoziiert (Golden *et al.* 2002). Deshalb müssen ROS und RNS streng reguliert werden, um frühzeitiges Altern und Krankheiten zu verhindern. Zellen verfügen über endogene und exogene Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress (Chakravarti u. Chakravarti 2007). Diese Schutzmechanismen finden sich im Zytosol, in der Zellmembran und im Extrazellulärraum. Es handelt sich dabei um antioxidative Enzyme, Komplexbildner und freie Radikalfänger, die freie Radikale unschädlich machen (Powers u. Lennon 1999). Zu den wichtigsten antioxidativen Enzymen gehören die Superoxiddismutase, die Katalase sowie die Glutathionperoxidase (Birben *et al.* 2012). Freie Antioxidantien sind beispielsweise die Vitamine A, C und E, Carotinoide, Glutathion und Harnsäure (Fanjul-Moles u. López-Riquelme 2016). Ein wichtiger Komplexbildner ist das Hormon Melatonin, das freie Radikale eliminiert und Redoxenzyme reguliert (Galano *et al.* 2011). Neben der eigenen antioxidativen Aktivität steigert Melatonin die Schutzmechanismen der Zelle, indem es die Synthese von antioxidativen Enzymen wie der Superoxiddismutase 1, Glutathionperoxidase und Glutathionreduktase stimuliert (Zhang u. Zhang 2014). Die Aktivität der endogenen antioxidativen Enzyme kann durch Ernährung, Sport und Altern beeinflusst werden. So zeigten Marzatico *et al.* (1997), dass die SOD1-Aktivität durch Langstreckenläufe ansteigt.

OS entsteht, wenn das Verhältnis von der Bildung freier Radikale zu Antioxidantien nicht mehr in Balance ist. Durch die Verschiebung der Balance in Richtung der freien Radikalbildung, sind die Antioxidantien nicht mehr in der Lage, die vielfältigen ROS ausreichend zu eliminieren (Sohal u. Orr 2012).

Unter allen Biomolekülen sind Lipide besonders anfällig für die Oxidation durch ROS. Alle Zellmembranen enthalten mehrfach ungesättigte Fettsäuren, die leicht oxidiert werden können. Durch die Peroxidation von Lipiden verändern sich Membraneigenschaften und toxische Substanzen können gebildet werden. Die Oxidation von Lipoproteinen führt zu Arteriosklerose (Young u. McEneny 2001). Proteine können durch Oxidation Aminosäuren verlieren oder fragmentiert werden, wodurch Struktur oder Funktionalität gestört werden kann (Radák *et al.* 1999). Die Oxidation von Proteinen und Aminosäuren geht mit einem Anstieg an Proteincarbonylgruppen einher. Mit Nukleinsäuren reagieren ROS, indem sie die stickstoffhaltigen Basen und das Zucker-Phosphat-Rückgrat angreifen. Die oxidativen Schäden in DNA sind zu einem großen Teil auf Radikale wie $H\bullet$ und $\bullet OH$ zurückzuführen. Hydroxylradikale verursachen Doppel- und Einzelstrangbrüche sowie Schäden an Pyrimidin- und Purinbasen, die allesamt zu einer Schädigung der Genomintegrität führen (Ziech *et al.* 2011). Kann die Zelle solche Schäden nicht reparieren, kommt es zum Zelltod oder die Mutationen in der DNA führen zur Entwicklung von Krebserkrankungen und neurodegenerativen Erkrankungen (Evans *et al.* 2004). Mitochondriale DNA (mtDNA) ist deutlich anfälliger für Mutationen als die nukleäre DNA. Mutationen in der mtDNA führen zu Störungen in der Atmungskette und unkontrollierte ROS-Produktion. Die hohe Mutationsanfälligkeit der mtDNA liegt am fehlenden Schutz durch Histone oder assoziierte Proteine sowie die hohe Transkriptionsrate (Dalle-Donne *et al.* 2003).

Neben den negativen Effekten von freien Radikalen auf die Zellen, übernehmen sie wichtige Aufgaben im Immunsystem bei der Bekämpfung von Bakterien. Des Weiteren dienen ROS in extrazellulären Signalwegen als sekundäre Botenstoffe und generieren spezifische Zellantworten. Proteine und andere am Signalvorgang beteiligten Moleküle durchlaufen Veränderungen des Redox-Zustandes (Halliwell 2013). So sind manche Oxidantien, z. B. H_2O_2 , überlebenswichtig für die Zelle, indem sie vielfältige Aufgaben übernehmen: Sie spielen wichtige Rollen in der Genregulation, in Signalübertragung, Proteinaktivierung und -deaktivierung, zelluläre Differenzierung und Apoptose (Brandes *et al.* 2009; Klomsiri *et al.* 2011).

1.7.3 SUPEROXIDDISMUTASE 1

1.7.3.1 AUFGABE UND VORKOMMEN

Die Superoxiddismutase 1 (SOD1) wurde von McCord u. Fridovich (1969) entdeckt. Das Enzym wird durch ein sogenanntes Ur-Gen kodiert (Landis u. Tower 2005; Culotta *et al.* 2006), dessen ursprüngliche Variante für die Kupfer-Zink-SOD in derselben Zeit entstand, zu der Sauerstoff in der Atmosphäre auftauchte (Landis u. Tower 2005). Die Evolution aerober Organismen, die in einer Sauerstoff-haltigen Atmosphäre überleben konnten, erforderte ein effektives Schutzsystem gegen ROS. Das Auftauchen von SOD-Enzymen wurde durch die Ausbreitung Sauerstoff-produzierender Pflanzen ausgelöst, die vor etwa 2 Milliarden Jahren begannen, Sauerstoff in die Atmosphäre freizusetzen (Temneanu *et al.* 2012). Man findet SOD-Enzyme in annähernd allen aeroben Organismen (Landis u. Tower 2005).

Die SOD ist ein wichtiger enzymatischer Schutzmechanismus der Zelle gegen Schäden durch freie Sauerstoffradikale. Innerhalb der SOD-Enzyme existieren 3 Isoformen, die alle der Klasse der Metalloenzyme angehören: Die SOD1 (CuZnSOD) bindet Kupfer- und Zinkionen im aktiven Zentrum und befindet sich intrazellulär im Cytosol, in nukleären Kompartimenten sowie in den Lysosomen von Säugetierzellen (Okamura 2003; Collins u. Blau 2006; Hardin 2006; Isojima *et al.* 2003). Zwei Homodimere von je 16 kDa bilden zusammen die 32 kDa große SOD1. Das humane *Sod1*-Gen ist auf Chromosom 21 (21q22) lokalisiert. Die Mangan-abhängige SOD2 (MnSOD) befindet sich in der Mitochondrienmatrix und besteht aus vier Untereinheiten von je 23 kDa, die ein Homotetramer bilden. Das humane Gen für die SOD2 liegt auf Chromosom 6 (6q25) (Kolárová *et al.* 2007). Die SOD3 ist ebenfalls eine CuZnSOD, jedoch befindet sich diese Isoform ausschließlich im Extrazellulärraum sowie in spezifischen Zelltypen und Geweben wie z. B. in humanem Plasma, Lymphe und Cerebrospinalflüssigkeit. Das 135 kDa große Enzym ist ein Homotetramer, dessen Gen auf Chromosom 4 (4p-q21) und 5 liegt (Karbovskyí *et al.* 2011; Sharma 2003; Dardente 2008). Da in jedem Phylum die extrazelluläre SOD3 größere Ähnlichkeit zur SOD1 desselben Phylums als zur SOD3 anderer Phyla aufweist, ist anzunehmen, dass die SOD3 vielfach durch Anhängen eines Signalpeptids an die SOD1 entstand (Landis u. Tower 2005).

Alle SOD-Enzyme wandeln mithilfe der Metallionen im aktiven Zentrum hochreaktive Superoxidanionen (O_2^-) in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) um: $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. Das Superoxid entsteht zuvor durch die Addition eines Elektrons an molekularen Sauerstoff:

$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$. Wasserstoffperoxid wird durch das Enzym Katalase in Wasser und Sauerstoff gespalten oder durch die Glutathionperoxidase zu Wasser reduziert, wobei Glutathion oxidiert wird. Die SOD ist somit das erste und wichtigste antioxidative Enzym, das die Zelle vor oxidativen Schäden schützt.

1.7.3.2 CIRCADIANE RHYTHMIK UND REGULATION DER SOD1

Die SOD1 zeigte in vielen Studien eine circadiane Rhythmik. Diese wurde erstmalig 1985 beschrieben und am zerebralen Cortex von Ratten untersucht (Díaz-Muñoz *et al.* 1985). Dabei lag der Aktivitätspeak in der nächtlichen Dunkelphase und stimmte mit dem Peak von Malondialdehyd, dem Abbauprodukt von Lipidperoxidation, überein. Beim Menschen wurde eine stark ausgeprägte circadiane Rhythmik der SOD1-Aktivität im Blutplasma gezeigt (Luo *et al.* 1997; Singh *et al.* 2005; Singh *et al.* 2003). Die *Sod1*-mRNA zeigt eine circadiane Rhythmik in der Leber von Mäusen, wobei die Expression weiblicher Mäuse höher ist als bei männlichen (Xu *et al.* 2012). Dies weist auf geschlechtsspezifische Unterschiede hin.

Die Expression des *Sod1*-Gens wird in Säugetierzellen durch eine Vielzahl von Signalen reguliert, zu denen auch der OS gehört (Zelko *et al.* 2002). Experimente zeigten, dass Melatonin zu einer gesteigerten SOD1-Aktivität führen kann (Hardeland 2005). Somit kommt Melatonin als Aktivator für die SOD1 infrage (Jang *et al.* 2011). Die Aktivität der humanen SOD1 wird auch durch die Vitamine D und E erhöht (Javanbakht *et al.* 2010).

1.7.4 ALTERN

1.7.4.1 THEORIE DES ALTERNS

Das menschliche Altern ist ein komplexer biologischer Prozess, zu dem es mehrere Theorien gibt. Es kommt zum Verlust physiologischer Funktionen in verschiedensten Geweben des Organismus. Natürliches Altern ist die häufigste Todesursache und Risikofaktor für verschiedenste pathologische Fehlfunktionen. Zu den bekannten Mechanismen des Alterns gehören OS, mitochondriale Fehlfunktion, Telomer-Verkürzung, Entzündungen und nicht-enzymatische Glykierung (Simm *et al.* 2015). Ein Erklärungsansatz für das Altern aller Organismen ist die Theorie der freien Radikale (Harman 1956). Ihr zufolge beruht das Altern auf einer Zunahme an freien Radikalen bei gleichzeitiger Abnahme an antioxidativen Mechanismen. Die intrazelluläre Menge freier Sauerstoffradikale wird dabei als der größte Einflussfaktor für die Lebensdauer angesehen. Diese Hypothese wurde in zahlreichen Zellkultur-, Invertebraten- und Säuger-Experimenten untersucht (Review Balaban *et al.* 2005).

Da freie Radikale insbesondere durch die Zellatmung entstehen, wurde ein Zusammenhang zwischen der metabolischen Aktivität und der Lebensdauer postuliert (Pearl 1928; Smeal u. Guarente 1997; Yu 2006; Sohal u. Orr 2012). Aerober Metabolismus und die damit einhergehende Generierung von ROS werden somit als Ursache für das Altern angenommen. ROS reagieren mit wichtigen Makromolekülen wie Kohlenhydraten, Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren und sind somit zytotoxisch (Chakravarti u. Chakravarti 2007; Pacifici u. Davies 1991).

Wie bereits beschrieben, entsteht ein Großteil der ROS im Zuge der Atmungskette in den Mitochondrien. Im Alter sinkt die Integrität der Mitochondrien (Shigenaga *et al.* 1994), was zu einer erhöhten Freisetzung von freien Radikalen führen kann. Die ROS können direkt die Mitochondrien-DNA und andere Organellen schädigen. Die altersbedingte Akkumulation von auf freie Radikale zurückzuführende mitochondriale Schäden leistet einen großen Beitrag zum Altern von Zellen, Geweben und dem Organismus. Alternativ können ROS die nukleäre DNA schädigen, das Protein p53 aktivieren und darüber den programmierten Zelltod einleiten. Auch werden andere Zellproteine direkt durch ROS geschädigt, was zum Altern beiträgt (Berlett u. Stadtman 1997).

Es gibt zahlreiche experimentelle Befunde, die belegen, dass ROS und Proteinoxidation wichtige Rollen für das Altern spielen. Einige werden hier kurz vorgestellt:

- 1) Arten mit einem hohen Stoffwechselumsatz haben kürzere Lebenserwartungen und altern schneller (Smeal u. Guarente 1997). Die einzige Ausnahme hiervon sind einige Vogelarten, die trotz hohem Stoffwechselumsatz hohe Lebenserwartungen haben (Ottinger *et al.* 2005).
- 2) Der Carbonylgehalt von Proteinen, der als Indikator für Proteinoxidation gilt, steigt im Alter in zahlreichen Geweben exponentiell an (Levine u. Stadtman 2001).
- 3) Eine Beschränkung der aufgenommenen Nahrungsmenge reduziert die ROS-Produktion und steigert sowohl mittlere als auch maximale Lebensdauer von Tieren (Koubova u. Guarente 2003; Yu 2006).
- 4) Die Überexpression von antioxidativen Enzymen durch transgene Techniken kann altersabhängige oxidative Schäden hinauszögern und so die Lebensdauer verlängern (Sohal u. Weindruch 1996).
- 5) Die Menge an mitochondrial produziertem O_2^- und H_2O_2 steigt mit zunehmendem Alter (Sohal 2002).

Oxidationen an Proteinen nehmen mit dem Alter in vielen Geweben zu und führen zu veränderten Sekundär- Tertiär- und Quartärstrukturen, fehlerhaften Faltungen, Aggregationen und Funktionsverlusten (Chakravarti u. Chakravarti 2007). Proteine können jedoch nicht nur durch freie Radikale geschädigt werden, sondern auch durch Sekundärprodukte des OS oder durch Glykierung, die sogenannte Maillard-Reaktion oder nicht-enzymatische Glykierung. Bei der Maillard-Reaktion binden Zuckerreste chemisch an Proteine, wodurch Amadori-Produkte bzw. *Advanced Glycation Endproducts* entstehen. Die Menge an Maillard-Produkten nimmt mit dem Alter zu. Sie kann jedoch durch eine selektive Kalorienbeschränkung (engl.: *caloric restriction* = CR) hinausgezögert werden (Chakravarti u. Chakravarti 2007). Ein Experiment mit Menschen zeigte, dass nach 6 Monaten CR die Nüchtern-Insulinkonzentration und die Körperkerntemperatur – beides Marker für Langlebigkeit – verringert waren (Heilbronn *et al.* 2006).

1.7.4.2 AUSWIRKUNGEN AUF DAS ALTERN

Die Auswirkungen des Alterns sind sehr vielfältig und divers. Die erhöhte Konzentration an freien Radikalen führt zu vermehrten Schäden innerhalb der Zellen. Der OS steigt mit zunehmendem Alter deutlich an. Dies untersuchten am Menschen u.a. Inal *et al.* (2001) unter Nutzung von Malondialdehyd als Marker für OS. Sie zeigten einen deutlichen Anstieg an Malondialdehyd ab dem 40. Lebensjahr bei beiden Geschlechtern, stärker jedoch bei Frauen. Durch die Erhöhung des OS nehmen OS-generierte Schäden wie beispielsweise Lipidperoxidationen mit dem Alter zu (Nohl 1993). An zahlreichen Enzymen wurden in Zusammenhang mit dem Altern oxidative Veränderungen beobachtet (Oliver *et al.* 1987; Carney *et al.* 1991). Darüber hinaus können auch Modifikation von Strukturproteinen schwerwiegende Auswirkungen auf die Zellfunktion nach sich ziehen (Shacter 2000). Eine Gruppe von Enzymen, wie DNA-Reparaturenzymen, Phospholipase A₂ und molekulare Komplexe (z. B. Proteasome) entfernen oder reparieren durch Oxidation entstandene Schäden an DNA, Lipiden und Proteinen. Diese Schutzantwort auf OS verfällt möglicherweise im Alter (Sohal *et al.* 1995). Altersbedingte oxidative Schäden kommen ubiquitär vor und steigen mit dem Alter exponentiell an (Sohal 1993).

Der geordnete Abbau von Proteinen durch Lysosomen wird mit dem Altern gehemmt (Szweda *et al.* 2002). Die meisten Proteine werden durch Proteasome abgebaut, solange die Proteine nicht zu stark oxidiert sind. Bei zu starker Oxidation kann es zu Aggregation kommen und die

proteasomale Hydrolyse wird verhindert. Die Aggregate werden auch *inclusion bodies* genannt, sind wasserunlöslich und akkumulieren in alternden Zellen (Grune *et al.* 2004). Eine weitere Folge des Alterns bei Tieren und Menschen ist somit eine Verringerung des proteasomalen Proteinabbaus (Farout u. Friguet 2006; Friguet 2002). Bei Menschen wurde ein starker Zusammenhang zwischen altersbedingten neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson und Alzheimer mit OS und der Akkumulation von abnormen und aggregierten Proteinen gefunden (Landis u. Tower 2005).

ALTERN UND SOD1

Diverse Studien zeigen bei Menschen einen negativen Zusammenhang zwischen dem Alter und der SOD1-Aktivität (Andersen *et al.* 1997; Bolzán *et al.* 1997; Özbay u. Dülger 2002). Es scheint bei beiden Geschlechtern eine deutlich Abnahme der SOD1-Aktivität ab dem 40. Lebensjahr zu geben (Inal *et al.* 2001). Der Funktionsverlust der SOD1 mit steigendem Alter könnte durch Glykierung des Enzyms ausgelöst werden (Arai *et al.* 1987). Da die SOD1 Kupfer- und Zinkionen benötigt, kann auch ein Mangel dieser beiden Elemente zu verminderter Aktivität führen (Wasowicz *et al.* 1989). Es besteht ein starker Zusammenhang zwischen der SOD1-Konzentration und dem Überleben von Zellen (Jang *et al.* 2011). Die Überexpression von SOD1 in *Saccharomyces cerevisiae* und *Drosophila melanogaster* konnte in Studien die OS-Konzentration senken und infolgedessen die Lebensdauer verlängern (Landis u. Tower 2005). Experimente mit humanen primären Fibroblasten haben gezeigt, dass gesteigerte Mengen an Superoxiddismutase lebensverlängernd wirken und mit einer verringerten Telomerverkürzung einhergehen (Serra *et al.* 2003). Wird die SOD durch RNA-Interferenz herunter reguliert, führte dies via einer Aktivierung von p53 zu Seneszenz (Blander *et al.* 2003).

ALTERN UND CIRCADIANE RHYTHMEN

Das Altern verursacht Veränderungen in den elektrophysiologischen und neurochemischen Ausgangsinformationen aus dem SCN. Die Amplituden elektrophysiologischer Aktivitäten und hormon-sekretierender Drüsen sowie die Genexpressionen verringern sich im SCN des alternden Gehirns von Nagetieren (Colwell 2011; Nygård *et al.* 2005; Beynon *et al.* 2009; Davidson *et al.* 2008; Kawakami *et al.* 1997). Die Verringerung der SCN-Funktion (Fanjul-Moles u. López-Riquelme 2016) führt bei alternden Menschen zu einer Beeinträchtigung der Synchronisation der inneren Uhren in den verschiedenen Körperzellen (Hofman u. Swaab 2006). Infolgedessen schwächt sich die menschliche und tierische innere Uhr mit

zunehmendem Alter ab und circadiane Rhythmen verringern sich und werden instabiler (Hofman u. Swaab 2006; Kondratov 2007). Bei älteren Menschen wurden ein Phasenvorschub sowie verringerte Amplituden insbesondere bei der Körperkerntemperaturrhythmik sowie bei der Hormonsekretion von Melatonin beobachtet (Hofman u. Swaab 2006; Skene u. Swaab 2003). Die Verringerung der Amplitude wurde überwiegend bei älteren Männern beobachtet, jedoch nicht bei älteren Frauen (Monk 2005; Monk *et al.* 1995). Die Abnahme der nächtlichen Melatoninsekretion kann zu Störungen im Schlaf-Wach-Rhythmus führen (Dijk *et al.* 1999). Eine verringerte Melatoninproduktion und eine veränderte Melatoninrhythmik können zu einer gesteigerten Konzentration an oxidativem Stress führen (Benot *et al.* 1998).

Die Veränderung von biologische Rhythmen scheint somit einen Beitrag zum Altern zu leisten (Banks *et al.* 2015). Alterns-assoziierte Veränderungen in der Melatoninrhythmik, mit einer früheren Phasenlage bei den Älteren, wurden identifiziert (Skene u. Swaab 2003). Die Funktion des SCN nimmt mit fortschreitendem Alter ab, besonders bei Patienten mit altersbedingten neurodegenerativen Erkrankungen (Pandi-Perumal *et al.* 2002; Wu u. Swaab 2007). Bei gesunden Probanden wurden SCN-assoziierte Veränderungen erst ab einem Alter von 80 Jahren beobachtet (Hofman u. Swaab 2006).

1.8 KÖRPERTEMPERATUR

1.8.1 KÖRPERKERNTemperatur

Die Körperkerntemperatur (KKT) des Menschen folgt einem ausgeprägten circadianen Rhythmus, der endogen generiert wird (Kräuchi u. Wirz-Justice 1994). Folglich bleibt diese Rhythmik auch in Abwesenheit äußerer Zeitgeber erhalten (Aschoff 1955; Kräuchi u. Wirz-Justice 1994). Um den Ablauf physiologischer Prozesse gewährleisten zu können, schwankt die KKT dabei nur eng um 37° C (Weinert 2010). Das Minimum der Körperkerntemperatur liegt in der nächtlichen Ruhephase zwischen etwa 4 und 6 Uhr (Aschoff *et al.* 1967; Kräuchi u. Wirz-Justice 1994). Das Maximum liegt gemäß einer Laborstudie am Ende der Aktivitätsphase um etwa 19 Uhr (Kräuchi u. Wirz-Justice 1994). Dabei kommt es zu leichten tages- und personenabhängigen Verschiebungen der Rhythmik. So erreichen Personen mit einer ausgeprägten Morgenpräferenz aufgrund der früheren Phasenlage ihr Temperaturminimum und -maximum früher als Abendtypen (Baehr *et al.* 2000). Zudem gibt es geschlechtsspezifische Unterschiede: Frauen erreichen in ambulanten Studien das nächtliche Minimum der KKT etwa 30 min früher als Männer (Baehr *et al.* 2000). Zudem schwankt die

KKT bei Frauen im Verlauf des Menstruationszyklus, wobei die KKT in der lutealen Phase im Mittel um $0,4^{\circ}\text{C}$ erhöht ist im Vergleich zur Follikelphase (Lee 1988).

Die Regulation der KKT erfolgt durch Wärmeproduktion und Wärmeabgabe (Kräuchi u. Deboer 2011) und wird über den Hypothalamus reguliert. Weicht die KKT von einem im Hypothalamus festgelegten Sollwert ab, so wird dies von temperaturempfindlichen Neuronen weitervermittelt. Der Hypothalamus stimuliert die Ausschüttung von wärmeregulierenden Hormonen wie Melatonin, die eine Gefäßerweiterung (Vasodilatation) bzw. –verengung (Vasokonstriktion) in der Haut vermitteln (Kräuchi 2002; Weinert 2010). Ab einem Alter von 60 Jahren nimmt die Regulationseffizienz signifikant ab (Collins *et al.* 1981).

Die KKT kann rektal, tympanal und oral gemessen werden. Die rektale Messung liefert die genauesten Ergebnisse (Bligh u. Johnson 1973), ist jedoch aufwändig durchzuführen. Da die oralen Messwerte den höchsten Zusammenhnag mit den rektalen Messwerten zeigen, wird häufig, insbesondere wenn die Probanden selbst Messungen durchführen, oral gemessen.

1.8.2 PERIPHERE HAUTTEMPERATUR

Die periphere Hauttemperatur steht in engem Zusammenhang mit der KKT. Sie weist ebenfalls einen endogen generierten circadianen Rhythmus auf und ist der KKT gegenläufig oder antiphasisch (Kräuchi u. Wirz-Justice 1994). Die Hauttemperatur ist Umwelteinflüssen wie der Umgebungstemperatur direkter ausgesetzt als die KKT. Infolgedessen kommt es bei der peripheren Hauttemperatur zu deutlich größeren Schwankungen und die Amplitude ist etwa dreimal so groß. Die KKT wird durch Wärmeabgabe an der Peripherie reguliert und gesenkt. Dies geschieht insbesondere über die Hände und Füße (Kräuchi u. Deboer 2011).

Blut ist dabei das Hauptmedium für den Wärmetransport vom Körperkern in die Peripherie, sodass der Wärmeaustausch über das kardiovaskuläre System angetrieben wird. Die abendlich ansteigende Melatoninkonzentration vermittelt eine Erweiterung der arteriovenösen Anastomosen (Kräuchi u. Deboer 2011). Dies sind Verbindungen zwischen Venen und Kapillaren in den distalen Hautregionen wie Fingern und Zehen. Die Öffnung dieser Verbindungen führt zu einer verstärkten Durchblutung der Peripherie und erleichtert darüber die Wärmeabgabe. Infolgedessen nimmt die periphere Hauttemperatur zu, wodurch die KKT sinkt. Die größte Wärmeabgabe erfolgt über die distalen Hautregionen wie Finger und Zehen und weniger über die proximalen Regionen wie Waden und Oberschenkel. Die proximale Hauttemperatur gleicht tagsüber eher der KKT, während sie in der Nacht denselben Verlauf

zeigt wie die distale Hauttemperatur (vgl. Abb. 5). Die periphere Hauttemperatur hat ihr Maximum in der nächtlichen Schlafphase und ihr Minimum zum Ende der aktiven Phase (Kräuchi 2002; Kräuchi u. Wirz-Justice 1994).

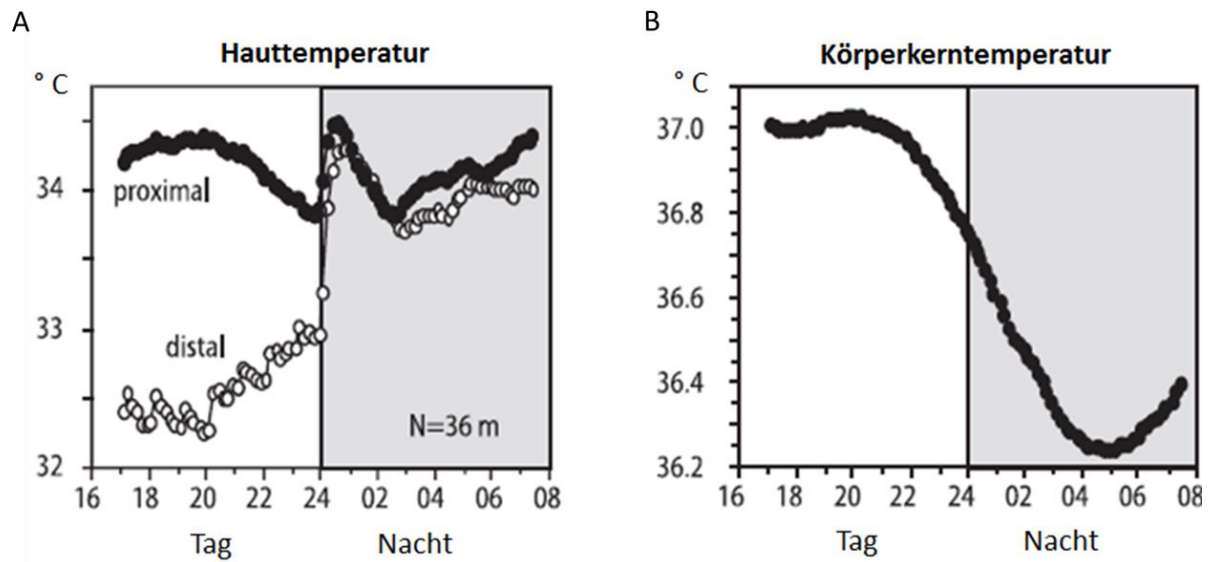


ABB. 5: VERLAUF DER HAUTTEMPERATUR (A) UND DER KÖRPERKERNTemperatur (B) (VERÄNDERT NACH KRÄUCHI 2002).

2 FRAGESTELLUNG

Die Lebensdauer nimmt in den Industrieländern seit den 1950er Jahren kontinuierlich zu und liegt aktuell bei etwa 80 Jahren (URL 4). Ein langes Leben bei guter Gesundheit, sprich gesundes Altern, wird insbesondere von Menschen in den Industrieländern angestrebt, weshalb die biologischen Grundlagen des Alterns aktuell ein wichtiger Forschungsgegenstand sind (Kirkwood 2008; Friedman *et al.* 2019). Alternsprozesse können durch Auswirkungen auf den SCN zahlreiche circadiane Rhythmen beeinträchtigen, die in der Folge instabiler werden (Fanjul-Moles u. López-Riquelme 2016; Kondratov 2007; Hofman u. Swaab 2006; Yamazaki *et al.* 2002). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Zusammenhang zwischen dem Uhrgenen *hBmal1*, dem *hSod1*-Gen und dem SOD1-Protein sowie Melatonin und dem OS. Darüber hinaus werden Parameter, die den Lebensstil betreffen, untersucht und mit den genannten Variablen in Verbindung gesetzt. Die Zusammenstellung der zu untersuchenden Parameter ergibt sich aus bisherigen Literaturbefunden. Tierexperimente (Kondratov *et al.* 2006; Kondratov *et al.* 2009) zeigten, dass murine *Bmal1*-Knockout-Mutanten verfrüht altern. Da das BMAL1/CLOCK-Heterodimer als aktivierender TF an E-Box-Motive in der Promotorregion Uhrgenen-kontrollierter Gene bindet und das *hSod1*-Gen über ein solches Motiv in seinem Promotor verfügt, sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen den Expressionen besteht bzw. ob auch das *hSod1*-Gen eine circadiane Rhythmik zeigt. Das *Sod1*-Transkript wird in die SOD1-Proteinform translatiert. Dieses Protein wirkt dem Zellstruktur-schädigenden und alternsassozierten OS entgegen und könnte somit den Alternsprozess beeinflussen. Melatonin ist ein wichtiger circadianer Marker, der sowohl die circadiane Rhythmik im SCN als auch die Transkriptionsrate des *Sod1*-Gens reguliert. Untersuchungen von Kondratov und Kollegen (2006) zeigten, dass in *Bmal1-Knock-out*-Mäusen verfrüht Alternerscheinungen auftraten und die Tiere früher starben als die Wildtypen. Diese Veränderungen gingen mit gesteigerten Konzentrationen an ROS einher. Alle genannten Variablen verändern sich mit zunehmendem Alter. Darüber hinaus werden die Variablen durch diverse Faktoren, die mit dem Lebensstil in Zusammenhang stehen, beeinflusst. Auf dieser Grundlage wurden die folgenden drei Fragestellungen entwickelt:

1. Unterscheiden sich jüngere versus ältere Frauen in den circadianen Merkmalsystemen Uhrengen-Expression (*hBmal1*), *hSod1*-Genexpression, SOD1-Proteinkonzentration, Melatoninkonzentration und oxidative Stresswerte?
2. In welchem Zusammenhang stehen *hBmal1*-Genexpression, *hSod1*-Genexpression, SOD1-Proteinexpression, Melatoninkonzentration und oxidativer Stress bei jüngeren und älteren Frauen?
3. Können altersabhängige Unterschiede in Melatoninkonzentration, oxidativer Stresskonzentration und SOD1-Proteinkonzentration mit Lebensstil-Parametern der Probandinnen in Verbindung gebracht werden?

In dieser Studie wurden nach Recherchen der Autorin erstmals die beschriebenen Parameter gemeinsam an Menschen untersucht und in Zusammenhang mit dem Altern betrachtet. Nach Wissen der Autorin wurde ein Zusammenhang zwischen *Bmal1* und *Sod1* bislang weder bei Tieren noch bei Menschen untersucht und ist somit ein Alleinstellungsmerkmal der vorliegenden Arbeit. Zur circadianen Rhythmik von *hSod1*-mRNA, SOD1-Protein sowie OS beim Menschen liegt nach Kenntnis der Autorin keine oder kaum Forschungsliteratur vor.

3 STUDIENDESIGN UND DURCHFÜHRUNG

STUDIENDESIGN

Um die oben genannten Fragestellungen zu untersuchen, wurde als Studiendesign eine Querschnittsstudie konzeptioniert. Da ein Vergleich zwischen jüngeren und älteren Probanden erfolgen sollte, wurden zwei Probandengruppen gebildet, von denen eine mit Teilnehmern im Alter von 20-30 Jahren die jüngere Altersgruppe bildete und eine weitere mit Teilnehmern ab 60 Jahren die ältere. Um aussagekräftige Daten in Bezug auf die circadianen Rhythmen zu erhalten, sollten in einem Zeitraum von 24 Stunden zu sechs Zeitpunkten Proben genommen werden. Zu jedem Zeitpunkt sollten Mundschleimhautzellen (MSH) für die quantitativen Analysen von mRNA-Mengen (*hBmal1* und *hSod1*) sowie für die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration (SOD1) gesammelt werden. Ebenso sollte zu jedem Zeitpunkt Speichel für die Messung der Melatoninkonzentration sowie tagsüber ebenfalls Speichel für die Bestimmung der Konzentration an OS im Speichel gesammelt werden. Des Weiteren sollten alle Probandinnen Fragebögen ausfüllen, mit denen die lebensstilbezogenen Parameter zu erfassen waren. Das Studiendesign ist in Abb. 6 dargestellt und wird im folgenden Abschnitt detailliert beschrieben.

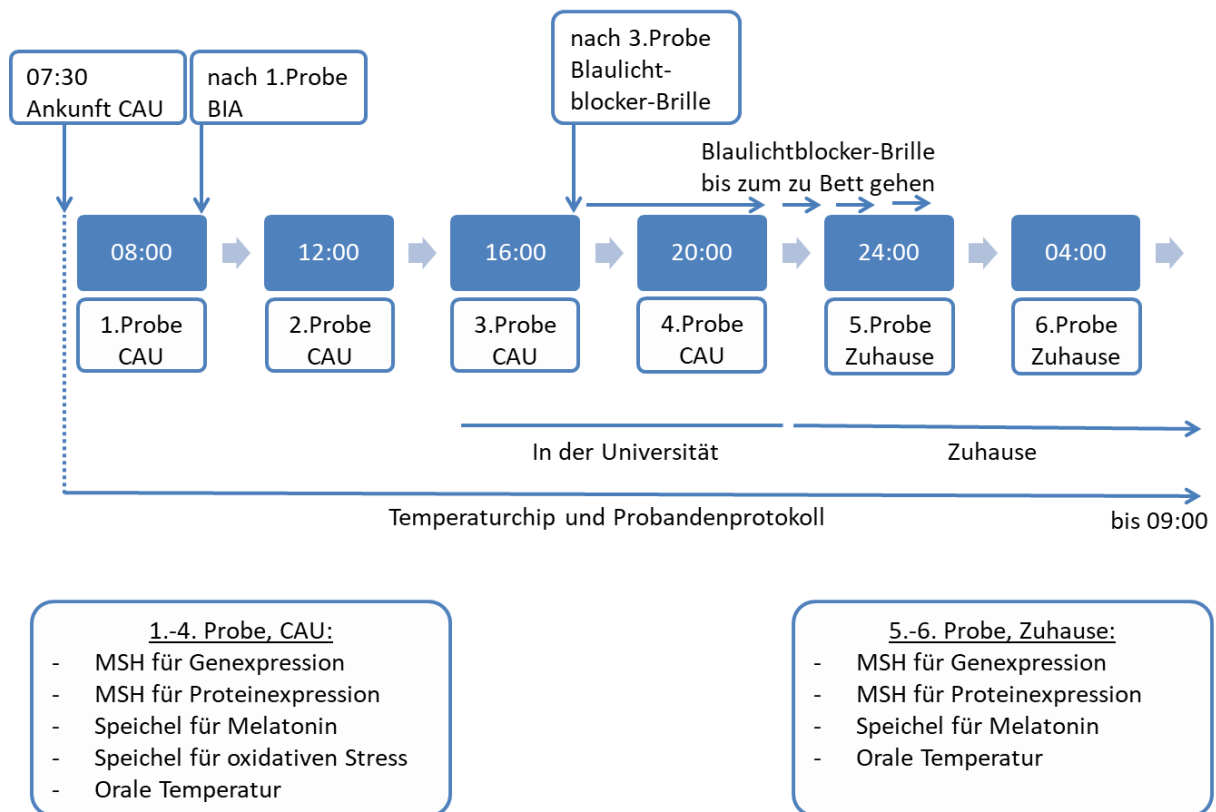


ABB. 6: SCHEMA DES 24-STÜNDIGEN VERSUCHSTAGES

BIA = Bioelektrische Impedanzanalyse, CAU = Christian-Albrechts-Universität Kiel, MSH = Mundschleimhautzellen

DURCHFÜHRUNG

Über einen Zeitraum von 24 Stunden wurden 6 Probensammlungen vorgenommen. Die Probandinnen wurden um 07:30 Uhr nüchtern in die Universität gebeten, wo zuerst ein Temperaturchip angelegt wurde. Um 08 Uhr erfolgte die erste Probennahme durch die Autorin. Weitere Probennahmen erfolgten um 12 Uhr, 16 Uhr und 20 Uhr unter Anleitung in der Universität sowie um 24 Uhr und 04 Uhr nachts durch die Probandinnen zuhause. Alle Probennahmen liefen in derselben Reihenfolge ab: Zuerst wurden mit einer Cytobrush MSH für die RNA-Analyse und mit einer zweiten Cytobrush MSH für die Proteinanalytik gesammelt. Anschließend folgte die Sammlung von je 1 mL Speichel für die Melatoninanalyse und die Bestimmung des oxidativen Stresswertes. Letztere Probe wurde nur in der Universität, nicht aber zuhause gesammelt, da die Proben umgehend bei -80°C zu lagern waren. Abschließend wurde die orale Körpertemperatur gemessen.

Nach der morgendlichen Probensammlung folgten die Messung anthropometrischer Kenndaten sowie eine bioelektrische Impedanzanalyse zur Bestimmung der Körperzusammensetzung. Von 16 bis 20 Uhr blieben die Probandinnen in der Universität, wo sie sich in einem separaten Untersuchungsraum der AG Humanbiologie ruhig und sitzend aufhielten, um eine Vergleichbarkeit der Situation vor dem abendlichen Melatoninanstieg zu gewährleisten. Während dieser Zeit füllten die Probandinnen Fragebögen aus. Von 16:15 Uhr bis zum zu Bett gehen trugen die Probandinnen eine Blaulichtblocker-Brille, die den Einfluss von Blaulicht auf die Melatoninsynthese unterbinden und somit einen ungehemmten Anstieg der abendlichen Melatoninkonzentration gewährleisten sollte. Am Folgetag kamen die Probandinnen ab 09 Uhr in die Universität, wo der Temperaturchip abgenommen und die nachts gesammelten Proben übergeben wurden.

Während des Zeitraums der Probensammlung führten die Probandinnen ein Protokoll, in dem Schlafzeiten, Zeiträume im Freien sowie Mahlzeiten notiert wurden. Die Zeiten für die Einnahme der Hauptmahlzeiten lagen zwischen 08:30-10:00 Uhr für das Frühstück, 12:30-14:00 Uhr für das Mittagessen sowie 18:00-19:00 Uhr für das Abendessen. Zwischenmahlzeiten oder Snacks waren erlaubt, etliche Lebensmittel waren jedoch wegen ihres Einflusses auf Melatonin nicht gestattet. Dazu gehörten wegen ihres hohen Melatoningehalts Walnüsse (Reiter *et al.* 2005) und Bananen (Dubbels *et al.* 1995) sowie anregende, koffeinhaltige Nahrungsmittel wie dunkle Schokolade, Kaffee, schwarzer und grüner Tee, Cola und Energy Drinks, deren Koffeinmoleküle, die Melatoninsynthese unterdrücken (Wright Jr. *et al.* 1997). Alkoholkonsum inhibiert die Melatoninsynthese (Ekman *et al.* 1993) und dehydriert den Körper, weshalb ab dem Abend vor dem Versuch sowie während des Versuchstages kein Alkohol konsumiert werden durfte. Ebenso sollte am Abend vor dem Versuchstag kein starker Sport getrieben werden und während des Versuchstages waren alle Sporteinheiten untersagt, um einen einheitlichen Hydratisierungszustand zu erreichen. Zudem verändert sportliche Aktivität die SOD1-Aktivität unverzüglich (Damirchi *et al.* 2015). Des Weiteren waren die Probandinnen dazu angehalten, während des Versuchstages möglichst wenig Zeit im Freien zu verbringen, um den Einfluss von Blaulicht auf die Melatoninkonzentration möglichst gering zu halten.

Vor dem Versuchstag führten die Probandinnen eine Woche lang ein Schlaftagebuch und waren instruiert, einen regelmäßigen Schlaf-Wach-Rhythmus einzuhalten. Dieser konnte mithilfe des Schlaftagebuchs überprüft werden.

4 PROBANDEN

Das Probandenkollektiv musste etliche Vorgaben erfüllen, um Störgrößen auszuschließen und eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die Ein- und Ausschlusskriterien werden im Verlauf dieses Kapitels detailliert aufgeführt und erläutert. Zunächst findet eine Charakterisierung des Probandenkollektivs statt. Es wurde ausschließlich ein Geschlecht untersucht, da es geschlechtsspezifische Unterschiede z. B. im oxidativen Stresshaushalt (Veglia *et al.* 2006), der *Sod1*-Expression (Xu *et al.* 2012) sowie bei altersbedingten Veränderungen von Temperaturrhythmik und Melatoninsekretion (Monk *et al.* 1995; Monk 2005) gibt. Die Wahl fiel für diese Studie auf weibliche Probandinnen, da diese ein größeres Interesse an gesundheitsbezogenen Studien haben und somit leichter zu rekrutieren waren.

Die Probandinnen wurden durch Aushänge in den Universitätsinstituten und Apotheken, Vorstellung der Studie in Sport- und Kartenspielgruppen, über die universitätseigene Website für Probandengesuche, über Anzeigen in der Kieler Zeitung „Kieler Express“ sowie durch mündliche Verbreitung rekrutiert. Junge Probandinnen wurden zusätzlich in Lehrveranstaltungen sowie über die Facebook-Gruppe „CAU Kiel“ erreicht.

Interessierte Probandinnen wurden zunächst telefonisch oder via Email über den Versuchsablauf informiert. Bei Eignung und Interesse an einer Teilnahme wurde ein Termin für eine persönliche Vorbesprechung vereinbart. Bei dieser wurde der genaue Versuchsablauf erläutert, Ein- und Ausschlusskriterien mittels eines Prätest-Fragebogens (Anhang A1) bestätigt und Informationsmaterial für den Versuchstag (Anhang A2) sowie ein Schlaftagebuch (Anhang A3) für die dem Versuchstag vorausgehende Woche ausgehändigt. Bei beidseitigem Einverständnis wurde ein Untersuchungstag festgelegt. An diesem wurde jeder Probandin eine Teilnehmerinformation für die eigenen Unterlagen sowie eine zu unterzeichnende Einverständniserklärung vorgelegt.

Es nahmen 42 Probandinnen an der Studie teil, von denen jeweils 21 jüngere und 21 ältere Frauen waren. Das mittlere Alter der jüngeren Probandinnen betrug 23,71 Jahre mit einer Standardabweichung (SD) von 2,31 Jahren und das Alter der älteren Probandinnen lag im Mittel bei $66,81 \pm 5,67$ Jahren.

Die Studie erhielt von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (CAU) ein positives Votum. Die Untersuchungen wurden ausschließlich im Herbst von September bis November sowie im Frühjahr von März bis Mai durchgeführt, da es jahreszeitliche Variationen in der Expression von Uhrengenen gibt (Dopico *et al.* 2015) und die Melatoninkonzentration durch die Tageslänge beeinflusst wird (Broadway *et al.* 1987).

EINSCHLUSSKRITERIEN

Um einen Vergleich zwischen zwei Altersgruppen durchzuführen, wurden zum einen jüngere Frauen im Alter von 20-30 Jahren untersucht und zum anderen ältere Frauen ab einem Alter von 60 Jahren. Diese mussten gesund sein, das heißt es durften zur Untersuchungszeit keine akuten Erkrankungen wie Erkältungen, Entzündungen oder Wunden vorliegen. Es wurden ausschließlich Nichtraucherinnen untersucht, da das Rauchen einen Einfluss auf die oxidativen Stresswerte hat (Özbay u. Dülger 2002; Burke u. FitzGerald 2003). Des Weiteren mussten die Probandinnen einen regelmäßigen Schlaf-Wach-Rhythmus haben, mit einer Zubettgehzeit zwischen 21 Uhr und 01 Uhr und einer Schlafdauer von 6 bis 9 Stunden pro Nacht. Diese Vorgaben sollten gewährleisten, dass nur Morgen- und Neutraltypen teilnehmen und der Schlaf-Wach-Rhythmus möglichst vergleichbar ist, um eine Verschiebung der Rhythmik von Genen, Proteinen und Hormonen durch unterschiedliche Rhythmik zu verringern. Bei einer außergewöhnlich kurzen (< 5 Stunden) oder langen (> 9 Stunden) Schlafdauer können die circadianen Rhythmen beeinflusst sein. Der Body Mass Index (BMI) sollte in der jüngeren Gruppe unter 25 kg/m² liegen und bei der älteren Gruppe unter 28 kg/m² liegen, da diese Werte gemäß Müller (2007) in der jeweiligen Altersgruppe ein Normalgewicht bedeuten. Adipositas verändert ebenso wie das Rauchen den Gesundheitszustand und den Stoffwechsel negativ (Greenberg u. Obin 2006; Spielmann *et al.* 2019). Die oxidativen Stresswerte werden erhöht und die Aktivität der SOD1 beeinflusst (Karaouzene *et al.* 2011; Wonisch *et al.* 2012). Ältere Probandinnen mussten im eigenen Haushalt leben, um eine selbstständige Organisation des Alltags zu gewährleisten.

AUSSCHLUSSKRITERIEN

Um einen geregelten Schlaf-Wach-Rhythmus sicherzustellen, durften die Probandinnen in den vorangegangenen drei Monaten nicht im Schicht- oder Nachtdienst gearbeitet (Monk u. Buysse 2013; Petrov *et al.* 2014) und in den vorherigen 30 Tagen keine Fernreise mit

verbundenem Jetlag unternommen haben (Rose *et al.* 1999). Auch Schlafstörungen bzw. eine subjektiv schlechte Schlafqualität, Tagesschläfrigkeit, Schlaf-Apnoe und die Einnahme von Schlafmitteln waren aus diesem Grund Ausschlusskriterien. Psychische Erkrankungen wie Depressionen oder Angststörungen führten zum Ausschluss, weil sie den Schlaf-Wach-Rhythmus ebenfalls beeinträchtigen können (Fava *et al.* 2006).

Da sich Schwangerschaften, Schilddrüsenüberfunktion und Hormonersatztherapie auf den Hormonhaushalt des Organismus auswirken, führten auch diese Kriterien bei Erfüllung zum Ausschluss. Dasselbe gilt für die Entfernung von Eierstöcken oder der Gebärmutter bei jüngeren Probandinnen, da das sekretierte Östradiol an Rezeptoren im SCN bindet und darüber die circadiane Rhythmik beeinflusst (Abizaid *et al.* 2004). Hochleistungssportlerinnen sowie Frauen, die aktuell oder kürzlich eine Diät durchführen, durften nicht teilnehmen. Der Blutdruck sollte unter 140 zu 90 liegen, da anderenfalls häufig Medikamente mit β -Blockern verabreicht werden, die die Melatoninkonzentration verändern. Da Hypo- und Hyperthermie sich auf die Körperkerntemperatur und die Hauttemperatur auswirken (Lim *et al.* 2008), führten diese beiden Faktoren zum Ausschluss. Systemische Erkrankungen wie Diabetes, akute oder weniger als 5 Jahre zurückliegende Krebserkrankungen, entzündliche (Darm-) Erkrankungen, schwere Anämie, Leberzirrhose, Niereninsuffizienz, Granulomatose, Lichen planus und Leukoplakia führten ebenso zum Ausschluss wie akute Erkrankungen wie Erkältungen, Magen-Darm-Infektionen, Blasenentzündungen oder ähnliches. Dasselbe galt für Erkrankungen des Mundraums, Zahnfleischbluten, Aphthen und Zahnarztbehandlungen im vorherigen Monat, da diese zu erhöhten Entzündungswerten führen können, die den oxidativen Stresswert erhöhen (Tóthová *et al.* 2013). In den sechs Wochen vor dem Untersuchungstag durften keine nicht-steroidalen Entzündungshemmer eingenommen worden sein, da diese Melatoninsynthese und Körpertemperatur verändern (Murphy *et al.* 1996). Die Einnahme von Betablockern, Melatonin oder Antibiotika, Immunsuppressiva innerhalb der vorherigen 6 Monate (Baňasová *et al.* 2015) sowie die Einnahme von Medikamenten gegen Depressionen waren weitere Ausschlusskriterien. Zudem durften keine blutsverwandten Probandinnen untersucht werden, um genetische Dispositionen auszuschließen.

5 MATERIAL

Die folgende Tabelle 1 listet alle für diese Studie verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte sowie Softwareprogramme für die Laboranalysen auf.

TAB. 1: MATERIAL

Chemikalien	Firma, Ort
Acrylamid/Bis Solution, 29:1	Roth, Karlsruhe
Agarose Broad Range	Roth, Karlsruhe
Albumin Fraction V	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat	Roth, Karlsruhe
Biorad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad, Hercules, USA
Clarity Max™ ECL Western Blot Substrate	Bio-Rad, Hercules, USA
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromidlösung 1% (10 mg/mL)	Roth, Karlsruhe
Glycine	Merck Millipore, Burlington, USA
HeLa Whole Cell RIPA Extract	Abcam, Cambridge, UK
IGEPAL CA-630	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Loading Dye	Thermo Scientific, Darmstadt
Methanol, ≥ 99,9%	Merck Millipore, Burlington, USA
Milchpulver Blotting grade, pulv., fettarm	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, 25%	Roth, Karlsruhe
SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
TRIS	Roth, Karlsruhe
Triton X-100 (für Molekularbiologie)	Roth, Karlsruhe
Tween-20	Merck Millipore, Burlington, USA
Wasser, doppelt destilliert	Roth, Karlsruhe
Wasser für die Molekularbiologie DEPC-behandelt	Roth, Karlsruhe
Wasser, HPLC	Merck, Darmstadt
Enzyme, Standards, dNTPs	
6x DNA Loading Dye	Thermo Scientific (Fermentas), St. Leon-Rot
DNase I, RNase-free	Thermo Scientific (Fermentas), St. Leon-Rot
FastStart Taq DNA Polymerase	Roche, Mannheim
GeneRuler low range DNA ladder	Thermo Scientific, Darmstadt
O'GeneRuler™ 100bp DNA Ladder	Thermo Scientific (Fermentas), St. Leon-Rot
PCR Grade Nucleotide Mix	Roche, Mannheim

Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Precision Plus Protein Standards	Bio-Rad, Hercules, USA
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Scientific (Fermentas), St. Leon-Rot
Primer und Sonden	
Primer	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Universal ProbeLibrary Probe (Sonden-Nr. 6, 11, 73)	Roche, Mannheim
Puffer	
PCR buffer (10x conc.) with MgCl	Roche, Mannheim
Roti [®] -CELL PBS	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese [®] 10x TBE-Puffer	Roth, Karlsruhe
4x SDS sample buffer	Merck, Darmstadt
10x TGS	Bio-Rad, Hercules, USA
Kits	
Crystal RNA Mini Kit	Biolab Products, Göttingen
DNA/RNA Oxidative Damage ELISA Kit	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
LightCycler [®] TaqMan [®] Master	Roche, Mannheim
Melatonin direct Saliva ELISA	IBL, Hamburg
Transcriptor First strand cDNA Synthesis Kit	Roche, Mannheim
Antikörper	
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody #7074	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
β-Actin Antibody #4967	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
SOD1 Antibody #2770	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Verbrauchsartikel	
Einmal-Küvetten	Brand, Wertheim
Falcon, 15 mL, 50 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Kanülen und Spritzen	Braun, Melsungen
LightCycler [®] Capillaries	Roche, Mannheim
Omnifix [®] Einmalspritzen mit Luer Anschluss	Roth, Karlsruhe
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen, 100-1000 µL, 2-200 µL, 0,1-20 µL, 0,1-2,5 µL	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß, 2 mL, 1,5 mL, 0,5 mL, 0,2 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipette	Sarstedt, Nümbrecht
Sterican [®] Kanülen	Roth, Karlsruhe
UVette [®] (50-2000 µL)	Eppendorf, Hamburg
Geräte	
Accu Block Digital Dry Bath	Labnet International Inc., Edison, USA

Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Body Impedance Analyzer Nutriguard-M	Data Input GmbH, Darmstadt
ChemiDoc™ Touch Imaging System with Image Lab™ Touch Software version 2.5.0.07	Bio-Rad, Hercules, USA
Digitale Personenwaage	Dirk Rossmann GmbH, Burgwedel
ELISA Reader Multiskan FC	Thermo Scientific, Darmstadt
Gel Jet Imager 2005	INTAS, Göttingen
GyroTwister	Labnet International Inc., Edison, USA
HLC Heizblock Thermostat HBT 130-2	Heap Labor Consult, Bovenden
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach
Microtiterplattenwaschgerät HydroFlex	Tecan, Männedorf, Schweiz
Personal Cyclor	Biometra, Göttingen
Präzisions-pH-Meter Lab 850	SI Analytics GmbH, Mainz
Präzisionswaage Kern EMP 200-2	Kern & Sohn GmbH, Balingen
TGradient-Cyclor	Biometra, Göttingen
Power-Supplies	
NanoPac-300	Roth, Karlsruhe
PowerPac™ Basic	Bio-Rad, Hercules, USA
Reagenzgefäßschüttler	
IKA® MS 3 digital	IKA, Staufen
Lab Dancer	VWR, Radnor, Vereinigte Staaten
RS-VF10	Phoenix Instruments, Garbsen
Zentrifugen	
Combi-Spin PVC-2400	Grant-bio, Cambridge, UK
Mikro 120	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Rotina 38R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Gefrier- und Kühlschränke	
Liebherr Comfort	Liebherr, Ochsenhausen
Premium NoFrost	Liebherr, Ochsenhausen
Privileg	Privileg, Stuttgart
Ultra Low Temperature Freezer U410	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Software	
Image Lab Software version 5.2.1	Bio-Rad, Hercules, USA
Light Cyclor Software Version 3.5	Roche, Mannheim
RelQuant Version 1.01	Roche, Mannheim
Sonstiges	
Capping-Tool	Roche, Mannheim
Cytobrush Plus GT	Medscand Medical, Berlin
Rotilabo-Blottingpapiere®, Dicke 1,0 mm	Roth, Karlsruhe
Roti®-NC 0,45, Transfermembran	Roth, Karlsruhe

6 METHODEN

6.1 FRAGEBOGENERHEBUNGEN UND SCHLAFTAGEBUCH

ALLGEMEINER FRAGEBOGEN ZUR ERFASSUNG VON DEMOGRAFISCHEN UND LEBENSSTIL-BEZOGENEN MERKMALEN

Der in der AG Humanbiologie der CAU entwickelte und für diese Studie speziell angepasste allgemeine Fragenbogen (Anhang A4) erfasst in 35 Fragen Familienstand, Wohnsituation, Beruf, Zeit im Freien, körperliche Aktivität und Sport, Schlafgewohnheiten, Gesundheitszustand, Ernährung, Medikamenteneinnahme und Erkrankungen, Häufigkeit, Verhütung und Menstruationszyklus.

CHRONOTYP –FRAGEBOGEN ZUR MORGEN-ABEND-PRÄFERENZ

Der Chronotyp der Probandinnen und somit ihre Einteilung in Morgen-, Neutral- und Abendtypen wurde mit Hilfe des *Morningness-Eveningness*-Fragebogens (D-MEQ) bestimmt (Anhang A5). Dieser wurde von Horne und Östberg (1976) entwickelt und den Probanden in der deutschen validierten Version von Griefahn *et al.* (2001) vorgelegt. Sie gaben Präferenzen und Wohlbefinden für verschiedene Tageszeiten an, die mit bestimmten Punktwerten kodiert sind. Die erreichbare Punktzahl liegt zwischen 16,0 und 86,9. Je höher die am Ende summierte Gesamtpunktzahl, umso größer war die Morgenpräferenz. Die Einteilung in die verschiedenen Chronotypen erfolgte anhand der erreichten Gesamtpunktzahl: Frühtypen von 59,0 – 86,9, Neutraltypen von 42,0 – 58,9 und Spättypen von 16,0 – 41,9.

PITTSBURGH SLEEP QUALITY INDEX

Dieser Fragebogen (PSQI) wurde ursprünglich von Buysse *et al.* (1989) entwickelt (Anhang A6). Er erfasst retrospektiv für die vergangenen vier Wochen die Schlafqualität der Probanden. Dazu werden in 19 Fragen die Häufigkeit schlafstörender Ereignisse, Einschlafzeit, Schlafdauer, Schlaffeffizienz, Einschätzung der Schlafqualität, gewöhnliche Schlafzeiten, Tagesschläfrigkeit und Schlafmittelkonsum erfasst. Diese werden in sieben Komponenten unterteilt und Punktwerte errechnet, die zwischen 0 und 3 liegen können. Durch Summation der Komponentenpunkte, errechnet sich der Gesamtpunktwert, der zwischen 0 und 21 variieren kann. Je niedriger dieser Wert ist, umso besser ist die subjektiv empfundene

Schlafqualität des Probanden. Ein Wert gleich oder kleiner 5 bedeutet eine gute Schlafqualität, wohingegen ein Wert größer als 5 für eine schlechte Schlafqualität steht.

EPWORTH SLEEPINESS SCALE

Der Epworth Sleepiness Scale (ESS) – Fragebogen von Johns (1991) dient der numerischen Erfassung von subjektiver Beeinträchtigung beziehungsweise Tagesschläfrigkeit bei Erwachsenen (Anhang A7). Der Proband gibt bei acht Fragen die Wahrscheinlichkeit an, mit der er in der beschriebenen Situation einnicken würde. Dabei stehen folgende Antworten zur Auswahl: „Würde niemals einnicken“, „geringe Wahrscheinlichkeit einzunicken“, „mittlere Wahrscheinlichkeit einzunicken“, „hohe Wahrscheinlichkeit einzunicken“. Zur Auswertung wird die Punktzahl der acht Fragen addiert und kann in Summe 0-24 Punkte betragen. Dabei gilt, je höher die Punktzahl ist, umso größer ist die Wahrscheinlichkeit für Tagesschläfrigkeit. Ab einer Gesamtpunktzahl von 11 wurden die Probandinnen der Gruppe „es liegt Tagesschläfrigkeit vor“ zugeordnet. Bis zu 10 Punkten lag per Definition keine Tagesschläfrigkeit vor (Johns 1991).

APNOEFRAGEBOGEN

Der Bundesverband Schlafapnoe Deutschland B S D e. V. hat einen Fragebogen zur Selbstprüfung von schnarchenden Mitmenschen herausgegeben, der von der Ruhrlandklinik in Essen erarbeitet worden ist, um die eigene Schlafapnoe ermitteln zu können (URL 5, Anhang A8). Dieser erfragt, wie häufig 13 Situationen zutreffend sind, wobei die Probanden zwischen den Abstufungen „nie“, „selten“, „oft“ und „sehr oft“ wählen können. Die Punktzahl steigt mit der gewählten Häufigkeit an. Die Punktsumme wird am Ende ermittelt und kann der Wahrscheinlichkeit einer Schlafapnoe zugeordnet werden. Dabei bedeuten 0-14 Punkte, dass ein Schlafapnoe-Syndrom unwahrscheinlich ist. Bei 15-25 Punkten ist eine Schlafapnoe ziemlich wahrscheinlich und bei mehr als 25 Punkten sehr wahrscheinlich. Die maximale Punktzahl liegt bei 39 Punkten.

SCHLAFTAGEBUCH

Das Schlaftagebuch der Deutschen Gesellschaft für Schlafforschung und Schlafmedizin (DGSM) beinhaltet je ein Abend- und Morgenprotokoll, das jeweils vor dem Einschlafen und nach dem Aufstehen auszufüllen war (Anhang A3). Im Vorfeld des Untersuchungstages waren die Probandinnen instruiert, eine Woche lang dieses Schlaftagebuch zu führen, das 16 Items enthält. Diese sollten im Zuge des Prätests Aufschluss über Leistungsfähigkeit und

Wohlbefinden, Erschöpfung, tageszeitliche Nickerchen, Alkoholkonsum vor dem zu Bettgehen, zu Bettgeh- und Einschlafzeit sowie Einschlafdauer liefern. Die Erholbarkeit des Schlafes, das Befinden nach dem Aufwachen, nächtliche Aufwacher und Wachzeiten, Aufwach- und Aufstehzeit, Gesamtschlafdauer und -liegezeit sowie Schlafmedikamentenkonsum wurden erfragt. Diese Angaben ermöglichten der Untersucherin Einblicke in die Regelmäßigkeit und die subjektive Qualität des Schlaf-Rhythmus vor dem Untersuchungstag und waren Teil des Prätests, der eine Grundvoraussetzung für die Teilnahme an dieser Studie darstellte.

LEBENSZUFRIEDENHEIT

Der für diese Studie angewandte Fragebogen zur Lebenszufriedenheit (Anhang A9) umfasst acht Fragen aus dem Fragebogen zur Lebenszufriedenheit mit insgesamt 70 Fragen nach Henrich u. Herschbach (2000) und ermittelte, wie zufrieden die Probandinnen in den letzten vier Wochen mit folgenden acht Bereichen ihres Lebens waren: Freunde/Bekannte, Freizeitgestaltung/Hobbies, Gesundheit, Einkommen/Finanzielle Sicherheit, Beruf/Arbeit/Studium, Wohnsituation, Familienleben/Kinder, Partnerschaft/Sexualität. Für jeden Bereich wählten die Probandinnen, ob sie damit unzufrieden, eher unzufrieden, eher zufrieden, ziemlich zufrieden oder sehr zufrieden waren. Die zugeordneten Punkte nahmen dabei mit der Zufriedenheit zu. Abschließend wurden die Punkte der acht Bereiche addiert und ergaben einen Gesamtwert, der je höher er ausfiel, für eine größere Lebenszufriedenheit sprach. Die maximale erreichbare Punktzahl liegt bei 40 Punkten.

STRESS

Um den Stress der Probandinnen im letzten Monat zu erfassen, wurde die deutsche validierte Version nach Klein *et al.* (2016) des *Perceived Stress Scale* (PSS-10) (Cohen *et al.* 1983) genutzt (Anhang A10). Dieser Fragebogen besteht aus zehn Fragen, die bestimmte Gefühlssituationen darstellen. Bei jeder einzelnen musste die Probandin entscheiden, wie oft sie sich wie beschrieben fühlte, wobei sie zwischen „nie“, „fast nie“, „manchmal“, „ziemlich oft“ und „sehr oft“ auswählen konnte. Jeder Option wurde ein Punktwert zugeordnet, der mit dem Stressempfinden ansteigt. Schlussendlich wurden alle Punkte der zehn Fragen zu einem Gesamtergebnis addiert. Je höher dieses ausfiel, umso mehr Stress empfanden die Probandinnen. Die maximale erreichbare Punktzahl beträgt 40.

6.2 ANTHROPOMETRIE UND PHYSIOLOGISCHE METHODEN

6.2.1 ANTHROPOMETRIE

Im Anschluss an die erste Probensammlung wurden zwischen 08:30 und 09:30 Uhr anthropometrische Kenngrößen erfasst und die Körperzusammensetzung ermittelt und in den Datenbogen eingetragen (Anhang A11). Die Körperhöhe wurde mittels eines mechanischen Rollmessbandes „Seca 206“ (Seca, Hamburg) auf 0,1 cm genau gemessen. Hierzu stellten sich die Probandinnen ohne Schuhe aufrecht mit geschlossenen Füßen und mit geradem Rücken an die Wand. Die Messkante des Rollmessbandes lag mittig auf dem Scheitel auf. Das Körpergewicht wurde ohne Schuhe und schwere Kleidungsstücke auf einer elektronischen Personenwaage (Model: TGF 302H, Dirk Rossmann GmbH, Burgwedel) auf 0,1 kg genau gemessen. Aus Körperhöhe und -gewicht wurde der Body-Mass-Index (BMI) nach folgender Formel berechnet:

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

Der BMI steigt mit dem Alter an, unter anderem da die Körperhöhe durch Rotation des Oberschenkelknochens in der Gelenkpfanne und Flüssigkeitsverlust in den Bandscheiben abnimmt, während das Gewicht oft durch vermehrte Einlagerung abdominalen Fettgewebes zunimmt.

Mit einem Maßband wurden Taillen-, Bauch- und Hüftumfang auf 0,5 cm genau gemessen. Der Taillen-Hüft-Index wurde durch Division des Taillenumfangs durch den Hüftumfang berechnet. Da beide Größen in cm gemessen werden, ist der Index durch den Wegfall der Einheiten nach der Division einheitslos. Dieser Index steigt mit zunehmendem Alter tendenziell an, da die abdominale Fettmasse mit dem Alter tendenziell zunimmt.

6.2.2 BIOELEKTRISCHE IMPEDANZANALYSE

Die Körperzusammensetzung des Menschen wird durch verschiedene Kompartimente, aus denen der Körper besteht, beschrieben. Das Ein-Kompartiment-Modell berücksichtigt ausschließlich das Körpergewicht und ist somit wenig aussagekräftig. Das Zwei-Kompartimentmodell unterscheidet zwischen Fettmasse (FM) und Fettfreier Masse (FFM) oder Magermasse (LBM). Im Drei-Kompartiment-Modell wird innerhalb der Fettfreien Masse weiter unterschieden zwischen Körperzellmasse (BCM) und Extrazellulärmasse (ECM). Das Gesamtkörperwasser (TBW) ist ein weiteres Kompartiment, welches weiter unterteilt werden

kann in intrazelluläres Wasser (ICW) und extrazelluläres Wasser (ECW). Die Zusammensetzung des Körpers durch verschiedene Anteile der Kompartimente gibt unter anderem Aufschluss über altersbedingte Veränderungen und Erkrankungen (Norman *et al.* 2007).

Die bioelektrische Impedanzanalyse ermittelt die Anteile aller oben genannten Kompartimente auf Grundlage einer elektrischen Widerstandsmessung. Diese beruht auf unterschiedlichen Leitfähigkeiten: Während elektrolythaltige Körperflüssigkeit eine hohe Leitfähigkeit hat, fungieren Zellmembranen als nichtleitende Minikondensatoren. Fett wirkt als guter Isolator und ist folglich ein schlechter Leiter. Bei der bioelektrischen Impedanzanalyse wird ein schwacher, nicht spürbarer Wechselstrom durch den Körper geleitet. Der Widerstand, den der Körper dem Stromfluss entgegensetzt, ist die Impedanz. Diese setzt sich zusammen aus der Resistanz und der Reaktanz. Die Resistanz ist der Ohm'sche Widerstand der elektrolythaltigen Körperflüssigkeit und die Reaktanz, die auch als kapazitiver Widerstand bezeichnet wird, entsteht durch die Kondensatoreigenschaften der Körperzellen (Kyle *et al.* 2004).

Das verwendete Mehrfrequenz-Bioimpedanzgerät *Multifrequenz-Impedanz-Analysator Nutriguard-M* (Data Input, Pöcking) misst den Widerstand bei drei verschiedenen Frequenzen von 5, 50 und 100 kHz. Während der Strom bei der geringsten Frequenz von 5 kHz Widerstände wie Zellmembranen kaum durchdringen kann, nimmt die Durchdringung mit steigender Frequenz zu und ermöglicht Rückschlüsse auf den Zellanteil im Körper. Mit einem Mehrfrequenz-Bioimpedanzgerät können mithilfe von Berechnungsformeln Fettmasse, Magermasse, Körperzellmasse, Extrazellulärmasse, Gesamtkörperwasser sowie extra- und intrazelluläres Wasser bestimmt werden. Anhand der ermittelten Körperzellmasse kann in der Folge indirekt der Grundumsatz des Probanden berechnet werden.

Zu dieser Messung mussten die Probandinnen nüchtern erscheinen. Zudem sollten sie am Tag zuvor keinen intensiven Sport getrieben und keinen Alkohol konsumiert haben, um einen möglichst einheitlichen Hydratisierungszustand zu erreichen. Für die Analyse befanden sich die Probandinnen in liegender Position, wobei die Handrücken nach oben zeigten. Alle Metallteile wurden zuvor von der rechten Körperseite entfernt, da sie die elektrische Leitfähigkeit über eine Herabsetzung des Widerstandes beeinflussen können. Es wurden je zwei Klebeelektroden mit einer leitenden Gelschicht (BIANOSTIC-AT®, Data Input GmbH, Darmstadt) auf Hand- und Fußrücken angebracht. Diese wurden mit Krokodilklemmen über

Kabel mit dem *Multifrequenz-Impedanz-Analysator Nutriguard-M* verbunden und alle drei Messungen nacheinander durchgeführt. Die ausgegebenen Werte für Reaktanz, Resistanz, Phasenwinkel sowie Handwiderstand wurden in die Software Nutri Plus 5.1 (Data Input, Darmstadt) eingegeben, die unter Zuhilfenahme von Gewicht, Größe, Alter und Geschlecht der Probandin die Körperzusammensetzung berechnete.

6.2.3 MESSUNG DER TEMPERATUR

PERIPHERE HAUTTEMPERATUR

Für eine kontinuierliche Messung der peripheren Hauttemperatur wurde ein Temperaturchip des Modells Thermochron-iButton DS1921H (Maxim Integrated, Dallas, USA) mit medizinischem Klebeband (Leukosilk, BSN Medical GmbH, Deutschland) unterhalb des linken Knöchels auf der Fußinnenseite fixiert. Dieser Chip wurde am Versuchstag direkt nach Ankunft der Probandin in der Universität, spätestens jedoch um 07:45 Uhr, angelegt, um eine ausreichende Anpassung an die Hauttemperatur der Probandin vor der ersten relevanten Messung um 08:00 Uhr zu gewährleisten. Der Chip wurde ausschließlich abgelegt, wenn die Probandinnen am Mittag, Nachmittag oder dem folgenden Morgen duschten. Anschließend wurde der iButton an derselben Stelle wieder befestigt und verblieb dort bis zum Folgetag um 09:00 Uhr. Um starke Temperaturschwankungen im Zeitraum des abendlichen Anstiegs der peripheren Hauttemperatur durch externe Faktoren auszuschließen, war es den Probanden untersagt, abends zu baden, zu duschen oder ein warmes Fußbad zu nehmen. Über den Zeitraum der Temperaturchip Messung führten die Probanden ein Protokoll (Anhang A12).

Die Auswertung erfolgte über einen Zeitraum von 24 Stunden, d. h. von 08:00 Uhr am Versuchstag bis um 08:00 Uhr am Folgetag. Der Chip zeichnete alle 10 Minuten die aktuelle Körpertemperatur der Probandin auf und speicherte diese. Zur Berechnung der circadianen Kenngrößen (Mesor, Akrophase, Amplitude) wurde die Software Chronos-Fit Version 1.06 (P. Zuther and B. Lemmer, <http://www.ma.uni-heidelberg.de/inst/phar/forschungLemmer.html>, 2004, Universität Heidelberg, Mannheim) verwendet. Die ermittelten Werte wurden in einen Datenbogen für iButtons eingetragen (Anhang A13). Darüber hinaus wurde die Hauttemperatur zu den sechs Zeitpunkten, an denen die Proben gesammelt wurden, manuell berechnet, indem aus den drei Messwerten, die der vollen Stunde am nächsten lagen, der Mittelwert gebildet wurde.

ORALE KÖRPERKERNTemperatur

Am Ende jeder Probensammlung wurde die orale Körperkerntemperatur mit dem digitalen Thermometer „*Thermoval rapid*“ (Hartmann, Deutschland) in Doppelmessung bestimmt und im Datenbogen vermerkt (Anhang A11). Hierzu wurde das Thermometer durch die Probandin für mindestens 2 min manuell vorgewärmt, anschließend auf der linken Seite unter der Zunge platziert und bei geschlossenem Mund die Temperatur gemessen. Wichen die Werte um mehr als 0,2° C voneinander ab, wurde eine dritte Messung durchgeführt und der stärker als 0,2° C abweichende Wert verworfen. Aus den beiden Messwerten wurde für weitere Analysen ein Mittelwert berechnet.

6.3 HORMONANALYSE

6.3.1 SPEICHELPROBENSAMMLUNG FÜR MELATONINANALYSE

Viele Hormone und Enzyme lassen sich im Speichel nachweisen und quantifizieren. Dazu gehört das Nachthormon Melatonin (Benloucif *et al.* 2008). Speichel ist leicht verfügbar, wird nicht invasiv gesammelt und trägt ein geringeres Risiko Krankheiten und Infektionen zu übertragen als Blut. Zudem können Speichelproben problemlos eingefroren und die Proben gelagert werden (Bibi *et al.* 2008; Deminice *et al.* 2010). Gleichzeitig ist Speichel dem Blut in seiner biochemischen Zusammensetzung sehr ähnlich und die antioxidative Kapazität beider Körperflüssigkeiten vergleichbar (Atsumi *et al.* 1999; Chapple *et al.* 1997).

Zur Bestimmung der Melatoninkonzentration im Speichel wurde bei jeder Probensammlung mindestens 1 mL Speichel in einem 2 mL Reaktionsgefäß gesammelt. Dabei durfte der Speichelfluss durch Kaubewegungen angeregt werden. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -20° C gelagert.

6.3.2 ENZYMIMMUNOASSAY FÜR MELATONIN

Der circadiane Melatoninrhythmus ist einer der am meisten genutzten circadianen Phasenmarker für Menschen (Benloucif *et al.* 2005; Klerman *et al.* 2002; Lewy *et al.* 1999). Die Melatoninkonzentration im Speichel wurde mittels des kompetitiven Enzymimmunoassays (ELISA) *Melatonin direct Saliva ELISA* von IBL (Hamburg) bestimmt. Die Wells der Mikrotiterstreifen sind mit einem Antikörper beschichtet. Das zugegebene biotinylierte Antigen und das Melatonin aus der zu bestimmenden Probe konkurrieren um die Bindung mit diesen Antikörpern. Ungebundene Antigenmoleküle werden nach der Inkubation durch

Waschen entfernt. Streptavidinperoxidase dient als Enzymmarker und Tetramethylbenzidin (TMB) als Substrat, welches das antikörper-gebundene biotinylierte Antigen bestimmt. Die Substratreaktion führt zu einer Farbbildung, deren Intensität umgekehrt proportional zur Antigen-Konzentration in der Probe ist.

Für die Analyse wurden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut, gründlich gevortext und für 10 min bei 2500 Umdrehungen pro Minute (rpm) und 4° C zentrifugiert. Anschließend wurden alle Proben gründlich auf Verfärbungen durch z. B. Blut untersucht, Auffälligkeiten gegebenenfalls dokumentiert und Analyseergebnisse auffälliger Proben später auf starke Abweichungen vom Mittelwert überprüft. Zur Durchführung des ELISA wurden je 100 µL der Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Wells der Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurden jedem Well 50 µL Melatonin-Antiserum hinzupipettiert, die komplette Platte mit Haftklebefolie abgedeckt und die Platte 10 sek vorsichtig manuell geschüttelt. Es erfolgte eine 18-stündige Inkubation bei 4° C. Die Folie wurde entfernt, die Inkubationslösung verworfen und die Wells der Mikrotiterplatte viermal mit je 250 µL Waschpuffer gewaschen. Alle Waschschritte wurden mithilfe des Mikrotiterplatten-Waschgeräts *HydroFlex* (Tecan, Männedorf, Schweiz) ausgeführt. In jedes Well wurden 100 µL Melatonin-Biotinlösung pipettiert und die Platte 2 Std bei RT und 500 rpm auf dem digitalen Schüttler *IKA® MS 3 digital* (IKA, Staufen) inkubiert. Die Platte wurde im Anschluss erneut viermal mit je 250 µL Waschpuffer pro Well gespült. Es wurden je 100 µL Enzymkonjugat in jedes Well pipettiert und die Platte für 1 Std bei RT und 500 rpm auf dem Orbitalschüttler inkubiert, gefolgt von weiteren 4 Waschdurchläufen mit je 250 µL Waschpuffer pro Well. In jedes Well wurden 100 µL TMB Substratlösung pipettiert, die Platte für 15 min bei RT und 500 rpm auf dem Orbitalschüttler inkubiert und die Reaktion danach mittels Zugabe von 100 µL Stopplösung je Well beendet. Zur Durchmischung wurde die Platte 5 sek geschüttelt und anschließend wurde die optische Dichte mit dem Photometer *ELISA Reader Multiskan FC* (Thermo Scientific, Darmstadt) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Referenzwellenlänge betrug 620 nm. Alle Proben wurden in Doppelbestimmung analysiert, aus denen für die weiteren Analysen ein Mittelwert gebildet wurde. Die Nachweisgrenze lag bei 0,3 pg/mL.

6.4 OXIDATIVE STRESSANALYSE

Da freie Radikale sehr instabile Moleküle sind, die schnell zerfallen, ist es sehr schwer, freie Radikale direkt nachzuweisen. Deshalb wird häufig darauf zurückgegriffen, Moleküle nachzuweisen, die durch freie Radikale geschädigt wurden. Dies können z. B. oxidierte Lipide, Malondialdehyd oder 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosin sein. Letzteres entsteht aus geschädigten DNA- und RNA-Molekülen und wird in der vorliegenden Studie als Nachweis für den OS genutzt.

6.4.1 SPEICHELPROBENSAMMLUNG FÜR OXIDATIVE STRESSANALYSE

Um den oxidativen Stresswert im Speichel zu bestimmen, wurde bei den ersten vier Probensammlungen von 08 bis 20 Uhr jeweils mindestens 1 mL Speichel in einem 2 mL Reaktionsgefäß gesammelt, wobei der Speichelfluss durch Kaubewegungen angeregt werden durfte. Die Proben wurden anschließend sofort bei -80° C eingefroren, um den Abbau oder Zerfall von oxidiertem Guanosin zu verhindern, und bis zur Analyse gelagert.

6.4.2 ENZYMIMMUNOASSAY FÜR OXIDATIVEN STRESS

Das *DNA/RNA Oxidative Damage ELISA Kit* (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) wurde verwendet, um den OS im Speichel zu bestimmen. Dieser kompetitive ELISA detektiert alle drei Formen oxidierten Guanins: 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosin (Abb. 7), das DNA entstammt, sowie 8-Hydroxyguanosin aus RNA und 8-Hydroxyguanin aus DNA oder RNA. Damit ist dieser Assay deutlich genauer als massenspektrometrische Verfahren oder andere Assays, die ausschließlich 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosin detektieren können. Folglich können die Werte dieses Assays nicht mit denen anderer verglichen werden, da sie höher sind. Der Assay hat eine Bandbreite von 10,3 – 3.000 pg/mL.

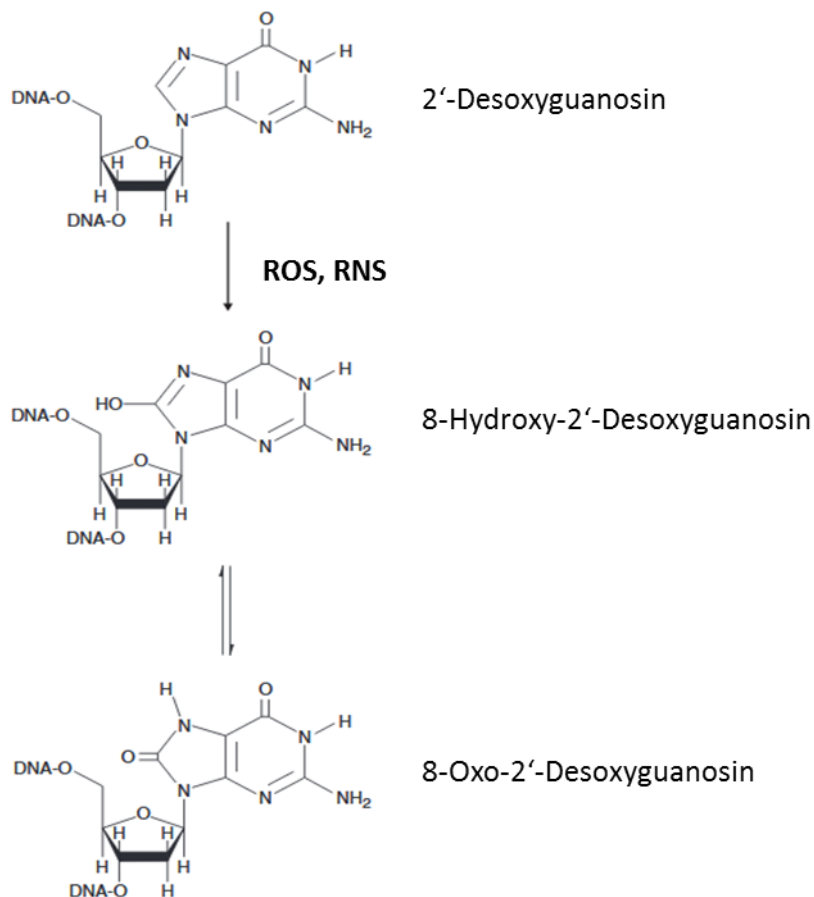


ABB. 7: OXIDATION VON GUANOSIN DURCH ROS UND RNS (URL 6).

In diesem kompetitiven ELISA konkurrieren durch Oxidation geschädigte Guaninmoleküle mit einem 8-OH-dG-Acetylcholinesterase-Konjugat um die Bindung an einen limitierten monoklonalen Antikörper. Da die Menge des Konjugats konstant gehalten wird, während die Menge an geschädigten Guaninmolekülen in den Proben variiert, ist die Menge des an den Antikörper gebundenen Konjugats umgekehrt proportional zu der Konzentration in der Probe. Die Antigen-Antikörper-Komplexe binden an die zuvor an die Platte gebundenen polyklonalen Antikörper. Freie Reagenzien werden durch Waschen entfernt. Durch Zugabe des Substrates für die Acetylcholinesterase kommt es zu einer enzymatischen Reaktion und einer Gelbfärbung der Lösung. Diese absorbiert Licht um einen Wellenlängenbereich von 412 nm. Die Extinktion der Lösung wurde photometrisch bestimmt. Die Intensität der Färbung ist umgekehrt proportional zur Konzentration an geschädigten Guaninmolekülen in der Probe. Das Schema des kompetitiven ELISA zum Nachweis von OS ist der Abb. 8 zu entnehmen.

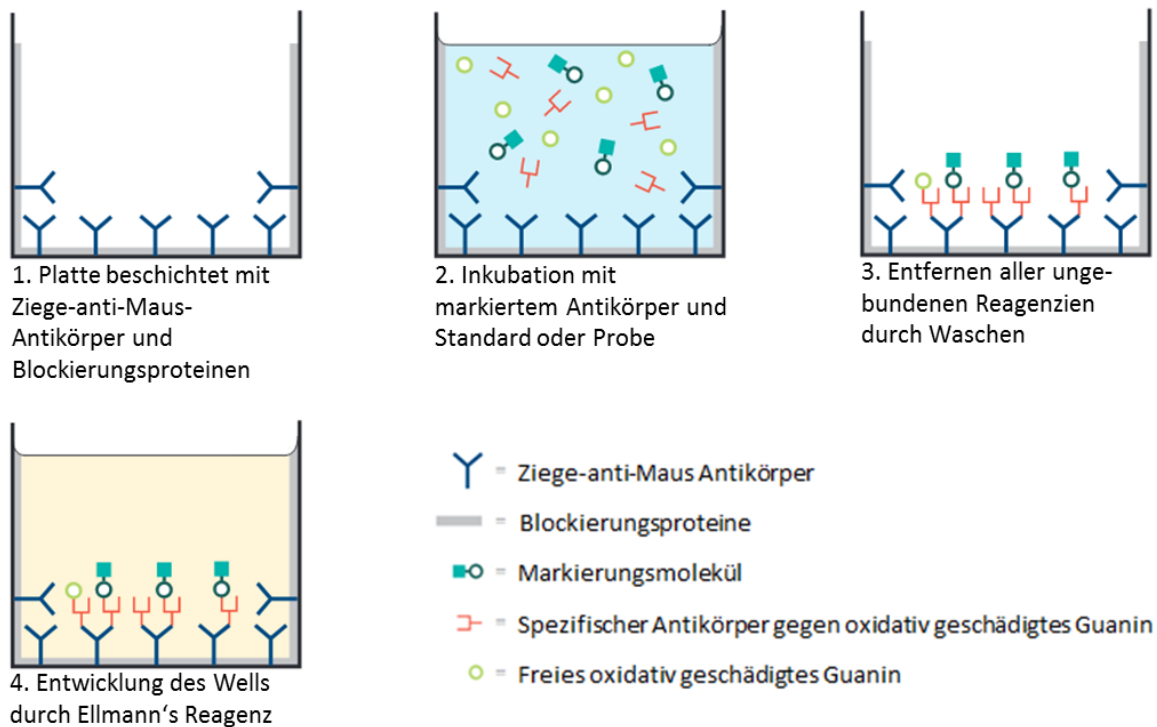


ABB. 8: SCHEMA DES ELISA ZUM OXIDATIVEN STRESSNACHWEIS VIA OXIDATIV GESCHÄDIGTEM GUANIN (VERÄNDERT NACH URL 7).

Zur Durchführung des ELISA wurden je 50 μL Probe oder Standard in die entsprechenden Wells pipettiert. Diesen wurden je 50 μL Tracer und 50 μL monoklonaler Antikörper hinzugefügt, die Platte mit Haftklebefolie abgedeckt und 18 Std bei 4° C inkubiert. Im Anschluss wurde die Folie entfernt, die Inkubationslösung verworfen und die Wells mit je 250 μL Waschpuffer viermal gewaschen. In jedes Well wurden 200 μL Ellman's Reagent pipettiert und die Platte für 1 Std bei RT und 500 rpm auf dem Orbitalschüttler im Dunkeln inkubiert. Die optische Dichte wurde danach mit dem Photometer bei 405 nm gemessen, wobei die Referenzwellenlänge 620 nm betrug. Für die Inkubation, das Waschen und die photometrische Messung wurden dieselben Geräte verwendet wie für den Melatonin-Assay (6.3.2). Alle Proben wurden in dreifacher Bestimmung analysiert, aus denen für die weiteren Analysen ein Mittelwert gebildet wurde.

6.5 MOLEKULARGENETISCHE METHODEN

6.5.1 SAMMELN VON MUNDSCHLEIMHAUTPROBEN FÜR MOLEKULARGENETISCHE ANALYSEN

Für die RNA-Analysen wurden Mundschleimhautzellen zu sechs Probenzeitpunkten gesammelt. Eine Stunde zuvor war den Probandinnen Essen, Trinken sowie das Putzen der Zähne untersagt. Dies sollte den Abrieb loser Zellen verhindern und somit die Zellausbeute bei der Sammlung erhöhen. Für die Sammlung strichen die Probandinnen jeweils eine Minute lang mit einer Cytobrush (Medscand Medical, Berlin) über die rechte Wangeninnenseite, wobei das Stäbchen nur in eine Richtung zu Rollen war, um den Verlust bereits gesammelter Zellen zu verhindern. Der Kopf der Cytobrush wurde mit den Zellen in 600 mL Lysepuffer (Biolab Products, Göttingen) in einem Reaktionsgefäß inkubiert und bis zur RNA-Extraktion am Folgetag bei 4-8° C gelagert.

6.5.2 HAUSHALTSGEN, ZIELGENE UND MESSZEITPUNKTE

Das humane Uhrgen *hBmal1* wurde als Schlüsselgen der negativen Feedbackschleife der circadianen Rhythmik analysiert. Über 24 Stunden lagen sechs Probenzeitpunkte, die zeigen sollten, ob eine circadiane Rhythmik, wie sie in der Literatur beschrieben wird, bestätigt werden konnte. Als zweites Zielgen wurde zu denselben Zeitpunkten das humane Gen *hSod1*, das für die antioxidative SOD1 kodiert, untersucht, um zu ermitteln, ob ein Zusammenhang zwischen den beiden genannten Genen besteht.

Um die verschiedenen Läufe der quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktionen (qRT-PCR) miteinander vergleichen zu können, wird in jedem Lauf eine Positivkontrolle mitgeführt. Die Quantifizierung des Zielgens wird ermöglicht, indem es ins Verhältnis zu einem Haushaltsgen gesetzt wird. Letzteres darf im entsprechenden Gewebe nicht reguliert werden und sollte eine möglichst ähnliche Expressionsstärke wie die Zielgene aufweisen. Für die Versuche dieser Arbeit wurde das humane Gen *h36B4* als Haushaltsgen gewählt, das in MSH-Zellen beide Voraussetzungen erfüllt, wie frühere Untersuchungen in der AG Humanbiologie gezeigt haben (Olbrich 2010). Dieses Gen kodiert für ein ribosomales Protein der 60S-Untereinheit von Ribosomen und wird in MSH weder tageszeitlich noch altersabhängig reguliert.

6.5.3 RNA-EXTRAKTION

Aus den MSH-Zellen wurde die RNA mittels des *CRYSTAL RNA Mini Kits* (Biolab Products, Göttingen) isoliert. Die Bürstenköpfe der Cytobrushs lagerten nach der Entnahme bis zum folgenden Vormittag bei 4-8° C in 600 mL Lysepuffer, der die Zellen lysierte. Zu Beginn der RNA-Extraktion wurden die Reaktionsgefäße 60 sek gevortext, um alle Zellen von dem Bürstenkopf zu lösen, der anschließend mit einer Pinzette entfernt wurde. Für eine vollständige Zellyse wurde das Lysat fünfmal mit einer sterilen Kanüle (Roth, Karlsruhe) möglichst ohne Schaumbildung auf- und abgezogen, gefolgt von einer dreiminütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Die lysierten Zellen wurden 2 min bei 1200 g und 4° C zentrifugiert (Rotina 38R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen) und das große Zelltrümmer enthaltende Pellet verworfen. Um weitere Zellfragmente zu entfernen, wurde der Überstand auf die Säule „D“ pipettiert und 2 min bei 12.000 rpm und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert (Mikro120, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen). Der in einem 2 mL Sammelgefäß aufgefangene Überstand wurde mit 900 µL 70%igem Ethanol gemischt. Dieses Gemisch wurde in zwei Läufen nacheinander auf die Säule „R“ pipettiert und je 2 min bei 12.000 rpm und RT zentrifugiert. Die RNA band an die Säule und konnte in den folgenden zwei Waschschrritten gereinigt werden. Hierzu wurden 500 µL Waschpuffer mit hoher Salzkonzentration (HS) auf die Säule gegeben und der Durchfluss nach einminütiger Zentrifugation (12.000 rpm, RT) wurde verworfen. Das Waschen wurde mit 700 µL Waschpuffer mit niedriger Salzkonzentration (LS) wiederholt und die Säule im Anschluss zum Entfernen restlicher Flüssigkeit und zum Trocknen 2 min bei 12.000 rpm und RT zentrifugiert. Um die RNA von der Säule zu eluieren, wurden 40 µL RNase freies Wasser auf die Säule pipettiert und 2 min bei RT inkubiert. Die Elution erfolgte durch 1 min zentrifugieren bei 8.000 rpm und RT. Das Eluat wurde sofort auf Eis gestellt und die RNA-Konzentration photometrisch gemessen.

6.5.4 PHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN

Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte mit einem Biophotometer (Eppendorf, Hamburg) direkt nach der RNA-Extraktion. Hierzu wurde 1 µL RNA-Eluat mit 59 µL RNase freiem Wasser gründlich und ohne Blasenbildung durch Auf- und Abpipettieren in einer UVette (Eppendorf, Hamburg) gemischt. Als Leerwert wurden 60 µL RNase-freies Wasser gemessen und zur Korrektur automatisch vom Messwert abgezogen. Das Photometer misst die Absorption der Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm und gibt die RNA-Konzentration in µg/mL an. Daneben wurden die Absorptionen von Aromaten, Phenolen,

Kohlenhydraten und Peptiden (bei 230 nm), Proteinen (280 nm) und der Trübung der Lösung (320 nm) gemessen. Das Verhältnis von Nukleinsäuren zu Proteinen d. h. von $A_{260/280}$ sollte zwischen 1,7-2,0 liegen, was eine nur geringe Verunreinigung der Probe durch Proteine indiziert. Die Konzentration der RNA sollte mindestens 30 µg/mL für die Weiterverarbeitung betragen.

6.5.5 ENZYMATISCHER VERDAU

Da in der extrahierten RNA-Lösung Kontaminationen durch DNA vorliegen können, wird ein Verdau mit dem Enzym Deoxyribonuclease I (DNase I) durchgeführt. Durch enzymatische Spaltung wird die DNA zersetzt, sodass eine DNA-freie RNA-Lösung vorliegt. Da es durch allgegenwärtige RNasen zum Abbau der RNA kommen kann, wird ein RNase-Inhibitor zugegeben. Dieser enthält verschiedene Proteine, die diverse RNasen hemmen.

Vom RNA-Eluat wurden 28 µL mit 1 µL RiboLock RNase-Inhibitor (Thermo Scientific, Darmstadt) vermischt. Für den DNA-Verdau wurden 4 µL 10x Reaction Buffer (Thermo Scientific, Darmstadt) und 4 µL DNase I (Thermo Scientific, Darmstadt) hinzupipettiert. Dieser Ansatz wurde 30 min bei 37° C in einem Heizblock (*Accu Block Digital Dry Bath*, Labnet International Inc., Edison, USA) inkubiert, um die enzymatische Spaltung zu ermöglichen. Anschließend wurden 4 µL EDTA (Thermo Scientific, Darmstadt) zugegeben, um zweiwertige Magnesiumionen zu binden, die für den enzymatischen Verdau benötigt wurden. Zum vollständigen Deaktivieren der Enzyme wurde der Ansatz im Heizblock *Accu Block Digital Dry Bath* (Labnet International Inc., Edison, USA) für 10 min auf 65° C erhitzt, um die Enzyme zu denaturieren, und im Anschluss sofort auf Eis gelagert. Bis zur cDNA-Synthese konnte die RNA bei -80° C im Gefrierschrank *Ultra Low Temperature Freezer U410* (New Brunswick Scientific, Nürtingen) eingefroren werden.

6.5.6 SYNTHESE KOMPLEMENTÄRER DNA

Die RNA wurde durch reverse Transkription in einzelsträngige cDNA umgeschrieben, die direkt für eine anschließende Echtzeit-PCR mit Gen-spezifischen Primern verwendet werden konnte. Hierzu wurde das *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche, Mannheim) verwendet, das eine rekombinante Reverse Transkriptase aus *Escherichia coli* enthält. Diese hat RNA-gerichtete DNA-Polymerase-Aktivität, DNA-abhängige DNA-Polymerase Aktivität, Entwindungsaktivität und RNase-H-Aktivität. Letztere degradiert RNA in DNA-RNA-Heteroduplexen und ermöglicht eine RNA-freie cDNA-Synthese. Das Kit enthält *Random-*

Hexamer-Primer und *Anchored-oligo(dT)₁₈primer*. Letztere binden an die Poly-A-Schwänze von mRNA. Die zufälligen Hexamerprimer binden innerhalb der RNA und ermöglichen eine gleichmäßige Transkription der gesamten RNA-Länge sowie die Transkription von RNA Molekülen ohne Poly-A-Schwanz.

Für einen doppelten cDNA-Synthese-Ansatz wurden 20 µL verdaute RNA langsam auf Eis aufgetaut und mit 2 µL *Anchored-oligo(dT)₁₈primer* und 4 µL *Random-Hexamer-Primer* gemischt. Dieser Ansatz wurde 10 min bei 65° C inkubiert, um die Denaturierung von RNA-Sekundärstrukturen sicherzustellen, und anschließend sofort auf Eis gestellt. Es wurden 8 µL *Transcriptor RT Reaction Buffer (5x)*, 1 µL *Protector RNase Inhibitor (40 U/µL)*, 4 µL dNTP-Mix (10 mM) und 1 µL *Transcriptor-Reverse-Transcriptase* hinzupipettiert, mit der Pipette kurz durchmischt und anzentrifugiert. Die Reverse Transkription erfolgte in einem Personal Cycler (Biometra, Göttingen) mit folgendem Programm: 10 min bei 25° C zur Anlagerung der Hexamerprimer, 30 min bei 55° C für die Reverse Transkription, 5 min bei 85° C zur Inaktivierung der *Transcriptor-Reverse-Transcriptase* und anschließende Kühlung bei 4° C bis zur Überführung in einen -20° C Gefrierschrank.

6.5.7 PRIMERDESIGN UND SONDEN

Für die Gene *hBmal1* und *h36B4* wurden bereits abteilungsintern Primer designed und Light-Cycler(LC)-PCRs etabliert. Für das *hSod1* Gen hingegen wurden durch die Autorin mithilfe der frei zugänglichen Online-Software *Assay Design Center (URL 8)* von Roche Primer entworfen. Hierzu wurde der *Homo sapiens* als Organismus und die *hSod1* als Zielgen ausgewählt. Über eine Verbindung zum *National Center for Biotechnology Information* suchte das Programm die Zielsequenz und erstellte mehrere Assays. Diese enthielten ein Intron-überspannendes Primerpaar sowie eine für die qRT-PCR benötigte *Universal ProbeLibrary (UPL)*-Sonde. Die Intron-überspannende Lage der Primer garantiert, dass keine genomische DNA vervielfältigt werden kann, da in diesen Exons liegen, die in der mRNA bereits herausgeschnitten wurden. Die Primerpaare der Assays wurden mit dem frei zugänglichen Online Programm *OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies, Coralville, USA, URL 9)* einzeln auf Dimerbildung überprüft. Die Schmelztemperaturen der Primerpaare sollten möglichst eng beieinander liegen. Geeignet erscheinende Primerpaare wurden bei MWG Eurofins (Ebersberg) synthetisiert. Die dazugehörige UPL-Sonde, die zwischen den beiden Primerpaaren binden kann, wurde bei Roche (Mannheim) bestellt.

Es wurden zwei Primerpaare mit den zugehörigen Sonden bestellt, um das bessere System explorativ zu ermitteln und anschließend in der LC-PCR einzusetzen. Zur Etablierung der Primerpaare in der qRT-PCR wurden vorab zwei Gradienten-PCRs durchgeführt, um die optimalen Anlagerungstemperaturen zu ermitteln und anschließend in einer LC-PCR geprüft, ob konstante Ergebnisse erzielt werden konnten.

Alle verwendeten Primer sind in der folgenden Tab. 2 aufgeführt.

TAB. 2: PRIMER ALLER VERWENDETEN GENE

Gen	Primer	Basensequenz	Amplikonlänge (bp)
<i>h36B4</i>	Fw	5'-tctacaaccctgaagtgcttgat	96
	Rev	5'-caatctgcagacagacactgg	
<i>hBmal1</i>	Fw	5'-caggaaaaataggccgaatg	66
	Rev	5'-gcgatgaccctcttatcctg	
<i>hSod1</i>	Fw	5'-tcaggagaccattgcatcat	131
	Rev	5'-ccaattacaccacaagccaaa	

6.5.8 GRADIENTEN-PCR UND ETABLIERUNG DER LIGHTCYCLER-PCR FÜR *hSOD1*

Um die optimalen Anlagerungstemperaturen für Primerpaare explorativ zu ermitteln, wurde eine Gradienten-PCR für das *hSod1* Gen durchgeführt. Bei dieser wurde während der Anlagerungsphase ein Temperaturgradient über den metallischen Heizblock gelegt. Im Anschluss wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt, um zu ermitteln, welche Anlagerungstemperatur das beste PCR-Ergebnis lieferte. Qualitätsmerkmale für ein gutes PCR-Produkt sind nur eine Bande im Gel, die möglichst deutlich d. h. stark sein sollte und die erwartete Amplikongröße hat, d. h. auf der richtigen Höhe im Gel läuft.

Die Gradienten-PCR wurde mit 12 unterschiedlichen Temperaturen über einen Temperaturgradienten von 10° C durchgeführt. Für jede Temperatur wurde eine Negativkontrolle ohne DNA zur Überprüfung des PCR-Laufs mitgeführt. Die Komponenten des Mastermixes sind der Tab. 3 zu entnehmen.

TAB. 3: MASTERMIX FÜR GRADIENTEN-PCR (EINFACHANSATZ)

Reagenz	Menge [μL]
HPLC-Wasser	20,05 μL
10x PCR-Puffer	2,50 μL
dNTP-Mix (100 mM)	0,25 μL
F-Primer (10 pmol/ μL)	0,50 μL
R-Primer (10 pmol/ μL)	0,50 μL
Taq-Polymerase	0,20 μL
DNA	1,00 μL

Der Mastermix wurde für 26 Proben angesetzt und je 25 μL luftblasenfrei in 0,2 μL Reaktionsgefäße pipettiert. Die Gradienten-PCRs wurden in einem *TGradient-Cycler* von Biometra (Göttingen) mit dem in Tab. 4 dargestellten Programm durchgeführt. Der Deckel des Thermocyclers wurde zu Beginn auf 104° C vorgeheizt.

TAB. 4: PROGRAMM FÜR GRADIENTEN-PCR MIT DEM „*hSOD1-40* PRIMER“

Schritt	Temperatur	Dauer	Zurück zu Schritt	a) Temperaturgradient und b) Zyklen
1.	95° C	5 min		
2.	95° C	30 sek		
3.	57° C	30 sek		a) 10
4.	72° C	30 sek	2	b) 36
5.	72° C	35 min		
6.	4° C	Pause		

Die Gradienten-PCR wurde in 37 Zyklen durchgeführt, d. h. die Schritte 2-4 wurden 36-fach wiederholt. Die Annealingtemperatur, bei der sich die Primer an den Matrizenstrang anlagern, sollte für das designte Primerpaar *hSod1-40* Primer laut der Software bei 57° C liegen. Deshalb wurde ein Temperaturgradient von 52,0° C bis 62,0° C gewählt, der eine 10° C Spanne abdeckte.

Für das zweite Primerpaar *hSod1-11* Primer wurde äquivalent eine Gradienten-PCR durchgeführt. Die vorhergesagte Annealingtemperatur sollte bei 56° C liegen, sodass ein 10° C Gradient von 51° C bis 61° C angelegt wurde. Da dieses Amplikon mehr Basenpaare enthält als bei dem oben genannten Primerpaar 40, wurden die Schritte 2-4 je 45 sek durchgeführt.

GELELEKTROPHORESE

Zur Auswertung der PCR wurden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Hierzu wurden 1,8 g Agarose (Roth, Karlsruhe) in 90 mL TBE-Puffer (Roth, Karlsruhe) aufgelöst. Bei RT wurde die Lösung auf etwa 40° C abgekühlt, 3,5 µL Ethidiumbromid zugegeben und nach kurzer Vermischung durch Schwenken in einen Gelrahmen gegossen. Nach dem Aushärten wurden je 10 µL PCR-Produkt mit 2 µL 6x *Loading Dye* (Thermo Scientific, St. Leon-Rot) auf das Gel aufgetragen. Zur Größenbestimmung wurden 3 µL Größenstandard (*GeneRuler low range DNA ladder*, Thermo Scientific, St. Leon-Rot) mitgeführt. Mit TBE-Puffer wurde eine einstündige Gelelektrophorese bei 40 Volt (15 min) und 100 Volt (45 min) durchgeführt. Die Detektion der Banden erfolgte im Anschluss unter UV-Licht mit einem *Gel Jet Imager 2005* (INTAS, Göttingen).

Anhand des Gelbildes wurden 2 Annealing-Temperaturen ausgewählt, die gute PCR-Produkte lieferten, d. h. es lag eine starke Bande bei der richtigen Amplikongröße vor und es waren keine Primerdimere oder Kontaminationen erkennbar. Mit diesen zwei Temperaturen, die etwa 5° C auseinanderlagen, wurde eine LC-PCR für das *hSod1*-Gen etabliert. Mit beiden Temperaturen wurde je eine LightCycler-PCR durchgeführt und die effizientere anhand der *Crossing Point*(CP)-Werte als endgültige Methode ausgewählt. Es wurde die Temperatur gewählt, bei der die CP-Werte konstant waren und niedriger lagen als bei der anderen Temperatur. Die Methode der LC-PCR wird im folgenden Abschnitt näher erläutert und das Vorgehen beschrieben.

6.5.9 QUANTITATIVE ECHTZEIT-POLYMERASEKETTENREAKTION

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde 1983 von Kary Mullis entwickelt und in der Folge revolutionierte sie die Molekularbiologie. Auf unkomplizierte Weise konnte DNA in kurzer Zeit exponentiell vervielfältigt werden und stand für weitere Analysen zur Verfügung. Die Erfindung der Echtzeit-PCR ermöglicht die Quantifizierung der DNA-Menge, da während jedes Zyklus der PCR die Menge eines Fluoreszenzfarbstoffes in Echtzeit (= *real time*) gemessen wird. Bei der TaqMan®-Methode kommen sogenannte Gensonden zum Einsatz. Diese bestehen aus mehreren Nukleotiden, die komplementär zu einem kurzen DNA-Abschnitt des nachzuweisenden Gens sind. Die Sonden tragen an je einem Ende einen Fluoreszenzfarbstoff (= *Reporter*) und einen Fluoreszenzlöcher (= *Quencher*). Solange sich Reporter und Quencher in räumlicher Nähe befinden, unterdrückt der Quencher die Fluoreszenz des Reporters. Diese

Wechselwirkung wird als *fluorescence resonance energy transfer* (= FRET) bezeichnet. Die Sonde lagert sich während der PCR *downstream* des Primers an und wird während der Elongation durch die Nukleaseaktivität der Taq-Polymerase abgebaut. Dadurch werden Quencher und Reporter voneinander getrennt und durch Anregung des Reporters mit Licht einer geeigneten Wellenlänge setzt das messbare Fluoreszenzsignal ein. Mit fortschreitender Zyklenzahl der PCR nimmt die Fluoreszenz folglich immer weiter zu.

KALIBRATOR

In jedem LC-PCR-Lauf von Ziel- und Haushaltsgen wird ein Kalibrator als Positivkontrolle mitgeführt. Der Kalibrator ist ein Gemisch aus verschiedenen cDNA-Proben und dient der Normalisierung der verschiedenen PCRs. Dies gleicht Lauf-zu-Lauf Unterschiede der PCR sowie Chargen Unterschiede der Reagenzien aus. Zur relativen Quantifizierung der cDNA wird das normalisierte Endergebnis berechnet, indem das Zielgen-Haushaltsgen-Verhältnis der Probe durch das Zielgen-Haushaltsgen-Verhältnis des Kalibrators dividiert wird.

$$\text{Normalisierte Ratio} = \frac{\text{Konz. Zielgen (PP)} / \text{Konz. Haushaltsgen (PP)}}{\text{Konz. Zielgen (K)} / \text{Konz. Haushaltsgen (K)}}$$

PP = Probanden-Probe, K = Kalibrator

Um ausreichend Kalibrator für alle LC-PCR-Läufe zu erhalten, wurde im Vorfeld von verschiedenen Personen wie beschrieben RNA aus MSH gewonnen, verdaut und cDNA synthetisiert. Die Proben wurden sehr gründlich gemischt, das Gemisch in einer LC-PCR getestet und bis zu den einzelnen Läufen aliquotiert bei -20° C gelagert.

STANDARDKURVE

Für beide Zielgene und das Haushaltsgen wurden separate Standardkurven erstellt, die den Konzentrationsbereich der Probandenproben abdeckten. Hierzu wurden separate Verdünnungsreihen erstellt, wobei die Anzahl der Replikate mit der Verdünnungsstufe stieg, da bei größerer Verdünnung eine größere Varianz erwartet wurde. Mittels der *LightCycler Software 3.5* wurde eine Regressionsgerade durch die Datenpunkte gelegt und somit die Standardkurve ermittelt. Hierzu wurden die CP-Werte graphisch gegen die logarithmierten cDNA-Konzentrationen der Standards aufgetragen. Die Steigung der Regressionsgerade (= *slope*) wurde zur Berechnung der Effizienz herangezogen. Letztere ist ein Maß für die Güte

der Standardkurve und berechnet sich nach der Formel $E = 10^{-1/\text{Slope}}$. Die Effizienz sollte optimalerweise bei 2,0 liegen, was bedeutet, dass die Menge an Amplifikat bei jedem PCR-Zyklus verdoppelt wird. Eine Effizienz von 1,8-2,0 wird als ausreichend betrachtet. Unterscheiden sich die Effizienzen von Ziel- und Haushaltsgenen, kommt es bei der nachfolgenden relativen Quantifizierung zu großen Abweichungen bei der Berechnung des Verhältnisses (= Ratio) zwischen Ziel- und Haushaltsgen. Um die Effizienzen zwischen Ziel- und Haushaltsgen zu vergleichen und eine Effizienzkorrektur vorzunehmen, wurde ein *Coefficient File* mit der *RelQuant Software* (Roche, Mannheim) erstellt.

LC-PCR

Für die Durchführung einer LC-PCR wurden alle Reagenzien auf Eis aufgetaut und dabei vor Licht geschützt. Alle Proben wurden im Duplikat analysiert und zusätzlich Duplikate der Positivkontrolle (= Kalibrator) sowie der Negativkontrolle mitgeführt. Für alle Proben inklusive der Kontrollen wurde ein Mastermix angesetzt. Für diesen wurden vorab 10 µL des Enzyms aus Gefäß 1a mit dem Inhalt des Gefäßes 1b zu einem Mastermix vermischt. Ein einfacher 20 µL Ansatz für eine Probe enthielt die in Tab. 5 aufgeführten Komponenten.

TAB. 5: KOMPONENTEN FÜR DEN EINFACHEN LC-PCR-ANSATZ

1. Primer-Sonden-Mix		
LC-Primer F	(MWG 10x)	1,0 µL
LC-Primer R	(MWG 10x)	1,0 µL
Sonde	Roche	0,2 µL
2. Master-Master-Mix		
Primer-Sonden-Mix	Kit, Roche	2,2 µL
Wasser PCR-grade	Kit, Roche	8,8 µL
Mastermix		4,0 µL
		15,0 µL
+ cDNA		5,0 µL
		20,0 µL

Je 15 µL des Master-Master-Mixes wurden in Glaskapillare (Roche, Mannheim) hinein pipettiert. Diese wurden in einem Metallblock bis zum Beginn der Analyse gekühlt. In jede LC-Kapillare wurden 5 µL cDNA (Probe oder Kalibrator) oder 5 µL Wasser PCR-grade als Negativkontrolle pipettiert. Die Kapillare wurden mit dem *Capping-Tool* (Roche, Mannheim)

verschlossen und 30 sek bei 3000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Kapillaren in das Probenkarussell des Light Cyclers eingesetzt, die Probenbelegung im Programm *LightCycler Software 3.5* eingegeben und das Programm für den PCR-Lauf festgelegt bzw. die Annealingtemperatur angepasst. Die Annealingtemperatur betrug für das Haushaltsgen *h36B4* 57° C, für *hBmal1* 55° C und für *hSod1* 58° C. Für die ersten beiden Gene waren die Annealingtemperaturen bereits abteilungsintern etabliert, während die optimale Temperatur für *hSod1* mittels einer Gradienten-PCR und LC-PCR-Läufen ermittelt wurde (vgl. 6.5.8). Der Ablauf eines LC-PCR-Laufs ist Tab. 6 zu entnehmen.

TAB. 6: PROGRAMM FÜR EINE LIGHT-CYCLER-PCR

PCR-Schritt		Temperatur	Dauer
Denaturierung		95° C	10 min
Amplifikation (40 Zyklen)	Denaturierung	95° C	10 sek
	Annealing	X° C	20 sek
	Extension	72° C	10 sek
Cooling		20° C	40 sek

X = Annealing Temperatur für das jeweilige Gen d. h. 57° C für *h36B4*, 55° C für *hBmal1* und 58° C für *hSod1*

Nach dem LC-PCR-Lauf wurden die Läufe mittels der Negativkontrolle auf Kontaminationen und die CP-Werte auf Stimmigkeit überprüft. Der CP-Wert gibt an, wann das Fluoreszenzsignal aus dem Hintergrund hervortritt und somit die exponentielle Phase (= Log-Phase) der PCR beginnt. Die CP-Werte der Duplikate durften dabei um nicht mehr als 0,5 voneinander abweichen. Anderenfalls wurde die LC-PCR für diese Probe wiederholt.

Wurden die oben beschriebenen Voraussetzungen erfüllt, erfolgte eine relative quantitative Expressionsanalyse des Zielgens der Probanden-Probe mit der *RelQuant-Software Version 1.01* (Roche, Mannheim). Für eine relative Quantifizierung ist kein Wissen über die Ausgangsmenge an cDNA in der Probe notwendig. Stattdessen wird anhand des Fluoreszenzsignals auf die Ausgangsmenge geschlossen. Je früher das Fluoreszenzsignal bei der LC-PCR aus dem Hintergrund tritt, d. h. je kleiner der CP-Wert ist, umso mehr cDNA des Zielgens lag in der Probe vor. Die cDNA-Menge ist abhängig von der Menge an mRNA, die aus den MSH-Zellen isoliert wurde. Da das Haushaltsgen in den MSH-Zellen nicht reguliert wird, liegt immer dieselbe Menge an mRNA für das Haushaltsgen vor und folglich ist auch die Menge an cDNA in der Probe gleich. Mithilfe der *RelQuant Software* wurde das Verhältnis der cDNA-

Konzentration des Zielgens zu der cDNA-Konzentration des Haushaltsgens bestimmt. Hierzu wurden die Ergebnisse der beiden LC-PCR-Läufe (Ziel- und Haushaltsgen) einer Probandenprobe mit dem zugehörigen *Coefficient File* aus den Standardkurven in das *RelQuant-Programm* geladen. Dieses erstellt das Verhältnis zwischen Ziel- und Haushaltsgen und somit die Ratio, d. h. das Verhältnis der theoretischen cDNA Anfangsmengen der beiden Gene.

6.6 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

6.6.1 SAMMELN VON MUNDSCHLEIMHAUTPROBEN FÜR PROTEINBIOCHEMISCHE ANALYSEN

Die Sammlung von Probenmaterial für die Proteinanalytik erfolgte, wie unter 6.5.1 beschrieben. Hierbei wurde die Cytobrush eine Minute über die linke Wangenseite gerollt und der Bürstenkopf anschließend in einem leeren 2 mL Reaktionsgefäß bei -20° C gelagert. Die Proteinextraktion erfolgte am Tag nach der Sammlung oder dem darauffolgenden Tag.

6.6.2 PROTEINEXTRAKTION

Um die Proteine aus den MSH zu isolieren, wurden die Proben kurz in je 800 µL Roti®-CELL PBS Puffer (Roth, Karlsruhe) bei RT aufgetaut. Anschließend wurden die Proben etwa 45 sek gevortext, um die Zellen von dem Cytobrush-Köpfchen zu lösen. Das Köpfchen wurde mit einer Pinzette entfernt und die Proben 5 min bei 3000 rpm und 4° C zentrifugiert (Rotina 38R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 60 µL NP-40 Lysepuffer (Tab. 7) mit je 1:100 Protease-Inhibitor (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) und Phosphatase-Inhibitor (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) lysiert. Hierzu wurde das Zellpellet fünfmal mit einer Pipettenspitze und anschließend siebenmal mit einer Sterican® Kanüle und Omnifix® Einmalspritze (Roth, Karlsruhe) resuspendiert. Nach einer zweistündigen Inkubation auf Eis zur vollständigen Zelllyse wurden die Proben kurz gevortext und 15 min bei 11.000 rpm und 4° C zentrifugiert, um Zelltrümmer abzutrennen. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgte in direktem Anschluss die Konzentrationsbestimmung der Proben. Die Lagerung erfolgte bei -80° C.

TAB. 7: BESTANDTEILE DES VERWENDETEN ZELLYSE-PUFFERS (NP-40) FÜR EINEN PUFFERANSATZ VON 80 ML

<u>NP-40 Puffer</u>		für 80 mL
TRIS Base	50 mM	0,4846 g
NaCl	150 mM	0,701 g
EDTA (50 mM)	2 mM	3,2 mL
Wasser, doppelt destilliert	-	~ 74 mL
Salzsäure, 25 %ig (pH 7,5)	-	~ 300 µL
NP-40 IGEPAL	1 %	800 µL
Triton X-100	1 %	800 µL
Wasser, doppelt destilliert	-	ad 80 mL
direkt vor Gebrauch dazu geben:		
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	1:100	1:100
Protease Inhibitor Cocktail	1:100	1:100

6.6.3 PHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PROTEINEN

Die Proteinkonzentration der wie unter 6.6.2 beschrieben extrahierten Proteinlösung wurde mit einem Bio-Rad Protein Assay basierend auf der Methode nach Bradford (Bradford 1976) bestimmt. Der in der sauren Bradford-Lösung enthaltene Farbstoff Coomassie® Brilliant Blue G-250 bindet an basische und aromatische Aminosäuren, insbesondere Arginin, und bewirkt so die Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm (Reisner *et al.* 1975; Fazekas de St Groth *et al.* 1963; Sedmak u. Grossberg 1977; Compton u. Jones 1985). Die Absorptionsmessung wurde mit einem Spektralphotometer durchgeführt und unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes wurde die Konzentration der Proteine in der Lösung durch die Autorin berechnet.

Zur Konzentrationsbestimmung wurden je 50-fache Verdünnungen von den Proteinextrakten hergestellt, indem 2 µL Proteinextrakt mit 98 µL doppelt destilliertem (dd) H₂O vermischt wurden. Hiervon wurden 20 µL in einer UVette (Eppendorf, Hamburg) mit je 1 mL 1:5 verdünntem *Biorad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad, Hercules, USA) vermischt. Nach 15-minütiger Inkubation in Dunkelheit wurde die Absorption mit einem Biophotometer (Eppendorf, Hamburg) bei 595 nm gemessen. Der Messwert wurde mit 50 multipliziert, was der eingangs beschriebenen Verdünnungsstufe entspricht. Eine UVette mit 20 µL ddH₂O und 1 mL Biorad-Lösung diente als Nullwert.

6.6.4 AUSWAHL VON HAUSHALTSPROTEIN, ZIELPROTEINEN UND MESSZEITPUNKTEN

Der Versuch diente dazu, herauszufinden, ob das SOD1-Protein tageszeitlichen Schwankungen unterliegt und ob gegebenenfalls ein Zusammenhang zwischen den Fluktuationen des Proteins und des Gens besteht. Deshalb wurden die Proben für Gen- und Proteinanalysen zu denselben Zeitpunkten gesammelt. Diese wurden so gewählt, dass sie gleichmäßig über 24 Stunden verteilt lagen. Das β -Aktin Protein eignet sich sehr gut als Haushaltprotein, um die aufgetragenen Proteinmengen auf einem Blot zu normalisieren, da es nicht reguliert wird. Um die Blots untereinander vergleichen zu können, wurde auf jedem Blot zudem eine definierte Menge (15 μ g) eines humanen Zellextrakts (*HeLa Whole Cell RIPA Extract*, Abcam, Cambridge, UK) aufgetragen, in dem das Zielprotein exprimiert wurde.

6.6.5 PROBENVORBEREITUNG UND GELE GIEßEN

Für eine Natrium-Dodecylsulfat (SDS) Gelelektrophorese werden die Proben mit SDS und einem niedermolekularen Thiol versetzt. Das im Probenpuffer enthaltene Dithiothreitol reduziert Disulfidbrückenbindungen in den Polypeptidketten. Das anionische Detergenz SDS unterbindet innerhalb eines Proteins Bindungen, die auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhen. Infolgedessen lösen sich Quartär-, Tertiär- und Sekundärstrukturen auf und das Protein liegt in seiner linearisierten, vollständig denaturierten Form vor.

Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und gevortext. 15 μ g Protein des Proteinextrakts wurde mit ddH₂O auf das Endvolumen von 10-13 μ L verdünnt und *4x SDS sample buffer* (Merck, Darmstadt) zugegeben. Nach erneutem Vortexen und kurzem Anzentrifugieren wurden die Proben 5 min bei 95° C auf dem HLC Heizblock Thermostat HBT 130-2 (Heap Labor Consult, Bovenden) denaturiert. Anschließend konnten sie direkt auf ein Gel geladen oder bis zu 24 Std bei 4-8° C gelagert werden.

Für die Gelelektrophorese wurden Gele mit 12% Polyacrylamid (Acrylamid/Bis-Solution, Roth, Karlsruhe) gegossen. Dieses Polymer besteht aus Acrylamidmonomeren, die durch das quervernetzende Reagenz N,N'-Methylbisacrylamid ein dreidimensionales Netzwerk bilden. Die Vernetzung der beiden Moleküle wird durch TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) und Ammoniumpersulfat ausgelöst.

Die Mischungsverhältnisse für Sammel- und Trenngele sind der Tab. 8 zu entnehmen. Etwa 4 mL des gemischten Trenngels wurden in zuvor mit 70%igem Ethanol gereinigte Rahmen gegossen und nach dem Aushärten mit etwa 1 mL Sammelgel überschichtet. Die 15er-Kämme

wurden luftblasenfrei eingesetzt und die Gele 45 min bei RT ausgehärtet. Anschließend konnten die Gele sofort beladen oder bis zu 24 Std bei 4-8° C in feuchten Tüchern und Plastikfolie gelagert werden.

TAB. 8: REAGENZIEN UND MENGENANGABEN FÜR TRENN- UND SAMMELGELE

<u>Trenngel</u>	12 %ig		<u>Sammelgel</u>	
Wasser, doppelt destilliert	1,75 mL		Wasser, doppelt destilliert	1,15 mL
TG-Puffer	1,25 mL		SG-Puffer	0,5 mL
Acrylamid	2 mL		Acrylamid	0,335 mL
APS (10 %)	40 µL		APS (10 %)	15 µL
TEMED	5 µL		TEMED	5 µL

6.6.6 DISKONTINUIERLICHE SDS-POLYACRYLAMID GELELEKTROPHORESE

Eine Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) trennt Moleküle elektrisch nach ihrer Größe und Ladung. Bei einer SDS-PAGE werden die Proteine im Vorfeld denaturiert und tragen durch Anlagerung negativ geladener SDS-Moleküle dieselbe Ladung. Folglich werden die Moleküle bei einer SDS-PAGE nur nach ihrer Molekularmasse aufgetrennt. Hierzu dienen Poren im Gel, die durch Vernetzung von Polyacrylamid und bis-Acrylamid entstehen. Je kleiner ein Molekül ist, umso schneller bewegt es sich durch die Poren des Gels und desto weiter läuft es im Gel. Die Poren ermöglichen somit ein molekulares Ausieben von Molekülen nach ihrer Größe. Die Moleküle bewegen sich im Gel aufgrund einer angelegten Spannung, die die negativ geladenen Moleküle zum Pluspol wandern lässt. Bei einer diskontinuierlichen Gelelektrophorese werden Puffer mit unterschiedlichen Ionenkonzentrationen verwendet. Ein großporiges Sammelgel, dient der Fokussierung der Moleküle zu einer scharfen Bande, bevor sie in das kleinporige Trenngel übertreten. Dies ermöglicht eine besonders gute Auftrennung und eine hohe Schärfe der einzelnen Proteinbanden.

Um die Proteinproben gelelektrophoretisch aufzutrennen, wurden je 15 µg Protein jeder Probe in die Geltaschen pipettiert. Des Weiteren wurden 6 µL *Precision Plus Protein Standards* (Bio-Rad, Hercules, USA) als Größenstandard und 15 µg *HeLa Whole Cell RIPA Extract* (Abcam, Cambridge, UK) als Vergleichsprobe auf das Gel aufgetragen. Letzteres diente dem Vergleich verschiedener Gele untereinander. Die Laufkammer wurde mit verdünntem 10x TGS (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) als Laufpuffer gefüllt und die Proteine 15 min im Sammelgel fokussiert und anschließend 45 min im Trenngel aufgetrennt. Die hierfür angelegten Stromstärken in

Milliampere (mA) sind Tab. 9 zu entnehmen. Die Spannung wurde variabel gehalten und betrug maximal 250 Volt.

TAB. 9: STROMSTÄRKE [mA] FÜR DIE GELELEKTROPHORESE

Gelanzahl	Sammelphase [mA]	Trennphase [mA]
1	12	24
2	24	48
3	36	72
4	48	96

6.6.7 WESTERN BLOT UND IMMUNOBLOT

Der Begriff „blotten“ (englisch *to blot* = kleksen) beschreibt die Übertragung bestimmter Substanzen auf eine Membran, die dort detektiert und quantifiziert werden können. Handelt es sich bei den Substanzen um Proteine, wird der Vorgang als Western Blot bezeichnet. Der Western Blot ermöglicht die Identifizierung und Quantifizierung spezifischer Proteine in einem Proteingemisch. Mittels eines antigenspezifischen Primärantikörpers werden die Proteine auf der Membran detektiert, weshalb dieses Verfahren auch als Immunoblot bezeichnet wird (Luttmann *et al.* 2006). Speziesspezifische enzymgekoppelte Zweitantikörper binden an den konstanten Teil des Erstantikörpers. Diese indirekte Markierung ermöglicht eine Signalverstärkung und somit eine Erhöhung der Sensitivität, da mehrere Zweitantikörper an den konstanten Teil des Erstantikörpers binden können. Durch Zugabe eines geeigneten Substrats kommt es zu messbarer Chemilumineszenz.

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde für diese Arbeit ein Wet Blot durchgeführt, da dies eine sehr schonende Art des Proteintransfers ist. Hierzu wurden das Gel und eine Nitrocellulosemembran (Roth, Karlsruhe) etwa 1 min in Transblot-Puffer (Tab. 10) äquilibriert. Anschließend wurden beide luftblasenfrei zwischen zwei ebenfalls in Transblotpuffer getränkten Filterpapieren und zwei porösen Schwämmen in ein Kunststoffgitter gelegt (vgl. Abb. 9). Dieses so genannte *Sandwich* wurde in die Gelkassette einer Blottingkammer eingesetzt, sodass das Gel zur Kathode und die Membran zur Anode ausgerichtet waren. Für die Übertragung der Proteine von dem Gel auf die Membran wurde eine Spannung von 100 Volt angelegt bei variabler Stromstärke (maximal 1,5 Ampere) und Leistung (maximal 150 Watt). Innerhalb von 1,5 Stunden wanderten die negativ geladenen

Proteine zur positiv geladenen Anode und damit auf die Membran. Anschließend wurde die Membran dreimal je 5 min in etwa 10 mL TBS-Puffer mit 0,1 % Tween-20 (Tab. 11) gewaschen.

TAB. 10: REAGENZIEN UND MENGENANGABEN FÜR TRANSBLOT-PUFFER

<u>Transblot-Puffer (10x): für Tank-Blot</u>	
TRIS Base	30 g
Glycin	144 g
Wasser, doppelt destilliert	ad 1 L
<u>Transblot-Puffer (1x): Gebrauchslösung</u>	
10x Transblot-Puffer	100 mL
Wasser, doppelt destilliert	700 mL
Methanol	200 mL
vor Gebrauch kühlen	

TAB. 11: REAGENZIEN UND MENGENANGABEN FÜR TBS- UND TBST-PUFFER

<u>TBS (10x) pH 7,5</u>		<u>TBST (10x) pH 7,5</u>	
TRIS Base	121,14 g	TRIS Base	121,14 g
NaCl	87,66 g	NaCl	87,66 g
Wasser, doppelt destilliert	800 mL	Wasser, doppelt destilliert	800 mL
HCl, 25 %ig (pH 7,5)	~ 100 mL	HCl, 25 %ig (pH 7,5)	~ 100 mL
Wasser, doppelt destilliert	ad 1 L	Tween-20	10 mL
		Wasser, doppelt destilliert	ad 1 L

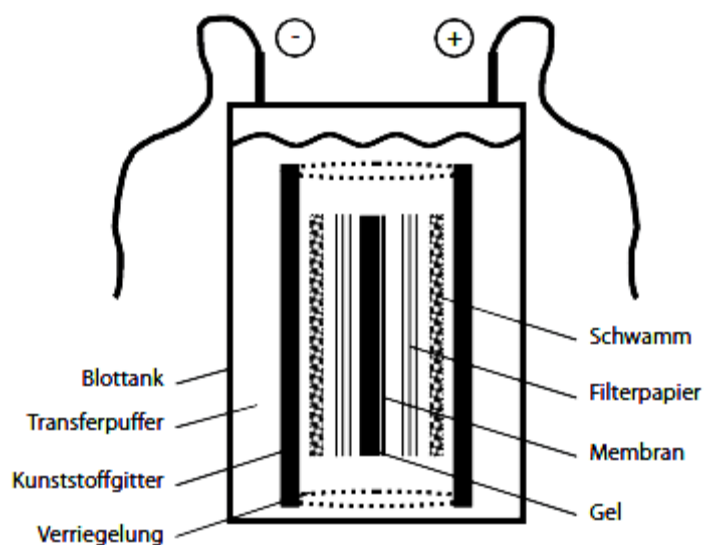


ABB. 9: AUFBAU DES WEST BLOTS (LUTTMANN *ET AL.* 2014)

Die freien Bindungsstellen der Membran wurden 1 Stunde lang mit etwa 10 mL einer 5%igen Lösung aus Milchpulver (Roth, Karlsruhe) in TBST blockiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Membran für je 5 min mit TBST wurde die Membran über Nacht bei 4° C mit einem spezifischen Erstantikörper inkubiert. Die verwendeten Antikörper sowie deren Verdünnung sind der Tab. 12 zu entnehmen. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal je 5 min mit TBST gewaschen und für eine Stunde bei RT mit dem enzymgekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen für je 5 min mit TBST sowie 5 min waschen mit TBS (Tab. 11).

Als Ladekontrolle wurde das in Mundschleimhautzellen nicht regulierte Protein β -Aktin verwendet. Dieses wurde im Anschluss an die Analyse des Zielproteins SOD1 quantifiziert, indem alle Schritte ab der Inkubation der Membran mit dem Erstantikörper wiederholt wurden.

TAB. 12: ANTIKÖRPER FÜR WESTERN BLOT UND DEREN VERDÜNNUNG

Erstantikörper	Verdünnung	Verdünnungsmittel
1. AK SOD1	1:2000	5 %ige BSA
1. AK β -Aktin	1:3000	5 %ige BSA
Zweitantikörper		
2. AK anti-rabbit	1:4000 für SOD1 1:7000 für β -Aktin	5 %ige Trockenmilchlösung

BSA = *bovine serum albumin Albumin Fraction V* (= Rinderserumalbumin)

6.6.8 ENTWICKLUNG UND BELICHTUNG DER BLOTS

Chemilumineszenz ist eine lichtemittierende chemische Reaktion. Aufgrund der hohen Sensitivität ist es eine weit verbreitete Methode zur Detektion von Western Blot Banden. Das an den Zweitantikörper gebundene Enzym Meerrettich-Peroxidase oxidiert bei Anwesenheit von Peroxid Luminol, wodurch Licht emittiert wird. Das aus der Reaktion resultierende Licht kann mit einem digitalen Aufnahmesystem detektiert werden. Da die an den Zweitantikörper gekoppelten Enzyme mehrere Substrate umsetzen, kommt es zu einer weiteren Signalverstärkung. Das Prinzip der Signalentwicklung eines ELISAs zum Nachweis eines spezifischen Antigens ist in Abb. 10 dargestellt.

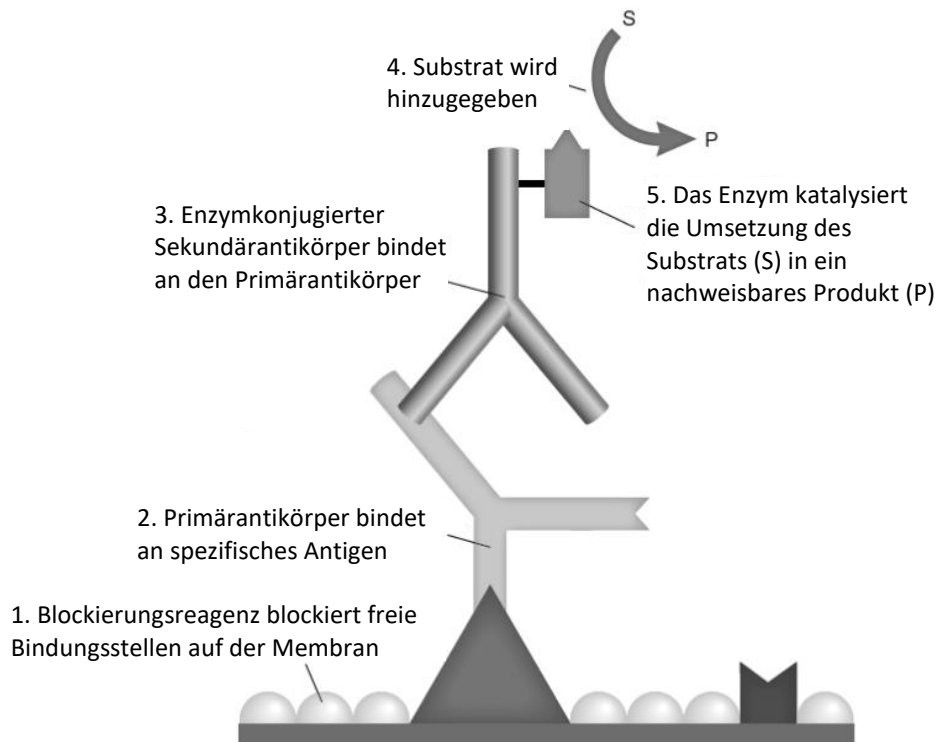


ABB. 10: SPEZIFISCHER ENZYMATISCHER NACHWEIS EINES MEMBRANGEBUNDENEN ANTIGENS (VERÄNDERT NACH URL 10)

Die Entwicklung der Blots erfolgte mit dem hochsensitiven *enhanced chemiluminescence* (ECL) Substrat *ECL Clarity Max* (Bio-Rad, Hercules, USA). Hierzu wurden die Komponenten A und B 1:1 gemischt und 2 mL des Gemischs für 5 min auf der Membran belassen. Anschließend wurde das Substrat mit Papiertüchern entfernt und die Membran in einem *ChemiDoc™ Touch Imaging System* mit *Image Lab™ Touch Software Version 2.5.0.07* (Bio-Rad, Hercules, USA) automatisch belichtet. Hierzu wurde die Belichtungsgröße auf 9,5 mal 7,6 cm gestellt und als Anwendung unter der Rubrik „Blots“ einmal die Chemilumineszenz- und einmal die Colorimetrische Aufnahme gewählt. Die Belichtung erfolgte automatisch unter der Einstellung „optimal“. Die Chemilumineszenzaufnahme zeigte die Proteinbanden und die Auflichtaufnahme den Marker. Durch Überlagerung der beiden Aufnahmen war eine Überprüfung der Proteinbandengröße möglich.

6.6.9 DENSITOMETRISCHE BESTIMMUNG UND BERECHNUNG

Bei der Densitometrie wird die Farbdichte quantitativ gemessen, das heißt, die Farbdichte pro Flächeneinheit wird bestimmt. Je mehr Farbe vorhanden ist, umso weniger Licht kann reflektiert oder transmittiert werden. Mithilfe dieser Methode können Western Blots

quantitativ ausgewertet werden, indem die Farbdichte der Chemilumineszenzaufnahme mit einem anderen Protein in Verhältnis gesetzt wird. Im vorliegenden Versuch wurde mittels der *Image Lab Software Version 5.2.1* (Bio-Rad, Hercules, USA) die Farbdichte densitometrisch bestimmt. Zur Normalisierung der Werte innerhalb eines Blots wurde die Ratio aus dem Zielgen SOD1 und der Ladekontrolle β -Aktin gebildet. Um die Ratios verschiedener Blots miteinander vergleichen zu können, wurde auf jedes Gel 15 μg eines *HeLa Whole Cell RIPA Extract* (Abcam, Cambridge, UK) als Standard mitaufgetragen. Die Farbdichte aller Proben wurde im Verhältnis zu diesem Standard berechnet.

6.7 STATISTISCHE METHODEN

Alle statistischen Analysen der in dieser Studie erhobenen Daten wurden mit dem Statistikprogramm SPSS Version 22 (IBM, New York, USA) für Windows durchgeführt. Die deskriptive Statistik ermittelte Mittelwerte, Standardabweichungen, Minima und Maxima. Ob eine Normalverteilung der Daten vorlag, wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test geprüft, der eine hohe Teststärke bei kleinen Stichproben aufweist (Razali u. Wah 2011). Bivariate Korrelationsanalysen prüften die Daten auf Zusammenhänge und wurden in Abhängigkeit von Skalenniveau und Normalverteilung nach Pearson (Korrelationskoeffizient r) oder Spearman-Rho (Korrelationskoeffizient r_s) durchgeführt. Die Effektstärke wird dabei nach Cohen (1992) folgendermaßen unterteilt: $r > 0,10$ schwacher Effekt, $r > 0,30$ mittlerer Effekt und $r > 0,50$ starker Effekt.

Um die Mittelwerte von Variablen bei jüngeren und älteren Probandinnen zu vergleichen und auf signifikante Unterschiede zu prüfen, wurde bei gegebenen Voraussetzungen ein t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Waren die Voraussetzungen für den t-Test nicht gegeben, wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Der Friedman-Test prüfte die Messwerte einer Variablen im Tagesverlauf (ab drei abhängigen Variablen) auf signifikante Unterschiede, sofern die Daten nicht normalverteilt waren. Bei Normalverteilung wurden die Daten mit einer Varianzanalyse für Messwiederholungen auf statistische Signifikanz geprüft. Um zwei abhängige Variablen auf signifikante Unterschiede zu überprüfen, kam bei Normalverteilung ein t-Test für zwei abhängige Variablen zum Einsatz und bei nicht-normalverteilten Daten ein Wilcoxon-Test.

In den statistischen Tests wurde ein Befund als statistisch signifikant betrachtet, sofern die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,050$ war. Bei einem p-Wert $< 0,010$ wurde das Ergebnis als sehr signifikant und bei einem p-Wert $< 0,001$ als hoch signifikant angesehen.

Grafiken wurden in SPSS Version 22 (IBM, New York, USA) sowie in Chronos-Fit Version 1.06 (Universität Heidelberg, Mannheim) erstellt und mit Powerpoint 2010 (Microsoft, Redmond, USA) bearbeitet.

7 ERGEBNISSE

7.1 METHODISCHE ASPEKTE

7.1.1 ETABLIERUNG DES *hSOD1*-ASSAYS

Um für das *hSod1*-Gen eine LC-PCR zu etablieren, wurden, wie unter 6.5.7 beschrieben, Assays mit Primerpaaren und einer dazugehörigen UPL-Sonde entworfen. Mithilfe einer Gradienten-PCR wurde die optimale Anlagerungstemperatur ermittelt. Das Ergebnis der Gradienten-PCR ist im Gelbild in Abb. 12 beispielhaft dargestellt. Die Gradienten-PCR lieferte bei allen Temperaturen über den 10° C Gradienten von 51° C bis 61° C sehr starke und scharfe Banden. Die Negativkontrollen enthielten alle keine PCR-Produkte, sodass DNA-Kontaminationen ausgeschlossen werden konnten. Die PCR-Produkte liegen zwischen der 100 und der 150 Basenpaarbande des Größenstandards (Abb. 11). Dies entspricht bei einem Amplikon von 131 Basenpaaren der Erwartung.

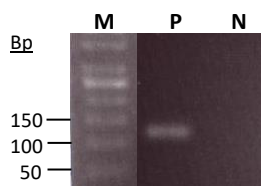


ABB. 11: AUSSCHNITT DES GELBILDES DER GRADIENTEN PCR FÜR DAS *hSOD1*-GEN.

M = Marker/Größenstandard, P = Produkt bei einer Annealingtemperatur von 57,8° C, N = Negativkontrolle, Bp = Basenpaare

Um Primer, Sonde und Anlagerungstemperatur für die LC-PCR zu etablieren, wurden zwei LC-PCRs mit unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt, bei denen die Produktbande in der Gradienten-PCR besonders deutlich hervortrat. Bei beiden Annealingtemperaturen (53° C und 58° C) wurden konstante CPs beobachtet. Allerdings lagen die CPs bei 58° C etwas niedriger. Da eine hohe Annealingtemperatur generell bevorzugt wird, wurden alle folgenden LC-PCRs für das *hSod1*-Gen mit 58° C als Anlagerungstemperatur durchgeführt. Das Fluoreszenzsignal der LC-PCR bei 58° C sowie die dazugehörigen CP-Werte sind in den Abb. 12 und Abb. 13 dargestellt.

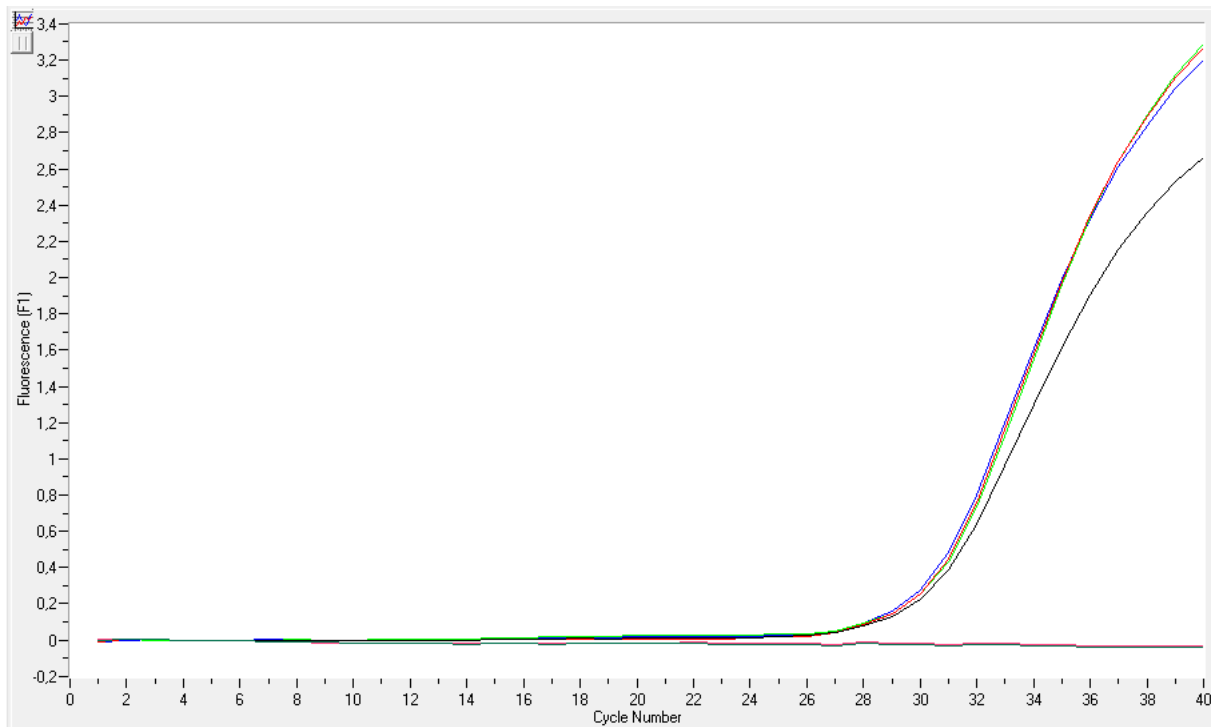


ABB. 12: FLUORESCENZSIGNAL DER LC-PCR FÜR DAS *hSOD1*-GEN MIT 40 ZYKLEN UND DER ANNEALINGTEMPERATUR VON 58° C. DIE NEGATIVKONTROLLEN TRETEN NICHT AUS DEM HINTERGRUND HERVOR.

	Posit...	Name	Calculat...	Cro...
—	1	LC11_Cal (unv.)	0.000E+00	30.11
—	2	Repli. of LC11_Cal (unv.)	0.000E+00	30.48
—	3	Repli. of LC11_Cal (unv.)	0.000E+00	30.29
—	4	Repli. of LC11_Cal (unv.)	0.000E+00	30.22
—	5	LC11_Neg		
—	6	Repli. of LC11_Neg		

ABB. 13: CROSSINGPOINTS (CRO...) DER LC-PCR FÜR DAS *hSOD1*-GEN. DIE NEGATIVKONTROLLEN (Neg) TRETEN NICHT AUS DEM HINTERGRUND HERVOR.

7.1.2 ERSTELLUNG VON STANDARDKURVEN UND ERMITTLUNG DER EFFIZIENZEN

Für alle zu analysierenden Gene wurden Standardkurven erstellt und anhand dieser die Effizienz der Replikation ermittelt. Im Optimalfall sollte die Effizienz bei 2,0 liegen, was bedeutet, dass in jedem Zyklus die Anzahl an Replikaten verdoppelt wird. In der Realität liegt die Effizienz jedoch häufig etwas niedriger. Die ermittelte Effizienz beträgt für das Referenzgen *h36B4* 1,90, für das Uhrgen *hBmal1* 1,81 und für das Gen der Superoxiddismutase *hSod1* ebenfalls 1,81. Die Standardkurven sind in den Abb. 14-16 dargestellt. Die X-Achse zeigt die

logarithmierte Verdünnung des PCR-Kalibrator-Ansatzes, der für die Erstellung der Standardkurve verwendet wurde. Auf der Y-Achse ist die Zyklanzahl dargestellt. Die Datenpunkte zeigen, bei welcher Verdünnungsstufe wie viele Zyklen notwendig sind, um das Signal aus dem Hintergrund hervortreten zu lassen und somit den CP zu erreichen. Je höher die Verdünnungsstufe des eingesetzten PCR-Gemisches, umso mehr Replikate wurden eingesetzt. Die Grafiken zeigen auch, wie weit die CPs der Replikate auseinander liegen.

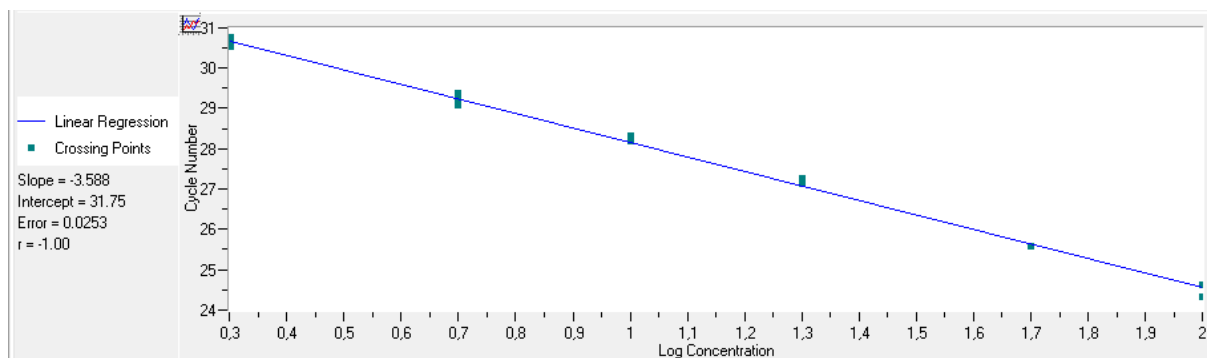


ABB. 14: STANDARDKURVE FÜR DAS HAUSHALTSGEN (REFERENZGEN) *H36B4*. Als Matrize zur Erstellung der Standardkurve wurden sechs definierte Verdünnungen der Kalibrator-cDNA verwendet. Die abgebildeten Punkte geben die *Crossing Points* der verschiedenen Ansätze an. Aus der Steigung der Standardkurve wurde eine PCR-Effizienz $E = 1,90$ berechnet.

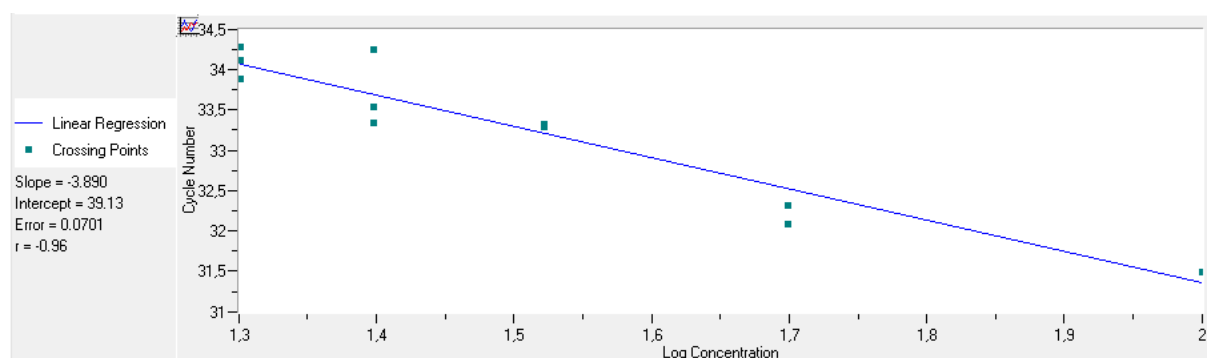


ABB. 15: STANDARDKURVE FÜR DAS UHRENGEN *HBMAL1*. Als Matrize zur Erstellung der Standardkurve wurden fünf definierte Verdünnungen der Kalibrator-cDNA verwendet. Die abgebildeten Punkte geben die *Crossing Points* der verschiedenen Ansätze an. Aus der Steigung der Standardkurve wurde eine PCR-Effizienz $E = 1,81$ berechnet.

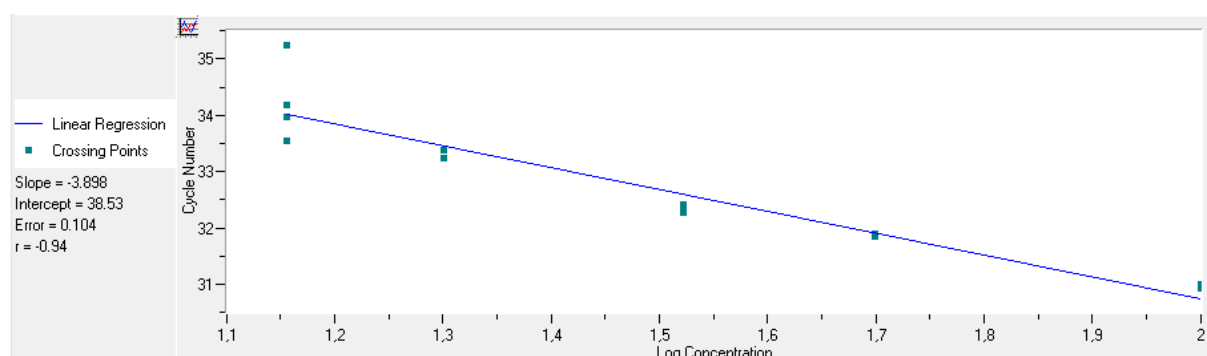


ABB. 16: STANDARDKURVE FÜR DAS SUPEROXIDDISMUTASEGEN *HSOD1*. Als Matrize zur Erstellung der Standardkurve wurden fünf definierte Verdünnungen der Kalibrator-cDNA verwendet. Die abgebildeten Punkte geben die *Crossing Points* der verschiedenen Ansätze an. Aus der Steigung der Standardkurve wurde eine PCR-Effizienz $E = 1,81$ berechnet.

7.1.3 ETABLIERUNG DES WESTERN BLOTS

Für die proteinbiochemischen Analysen im Rahmen dieser Arbeit wurden die Methoden SDS-PAGE und Western Blot laborintern etabliert. Für die Detektion wurden verschieden sensitive ECL-Reagenzien zur Entwicklung der Blots sowie diverse Antikörperkombinationen und -verdünnungen getestet. Des Weiteren wurde für jedes Protein das optimale Mittel zum Blockieren freier Bindungsstellen auf der Membran sowie das Verdünnungsmittel für die Antikörperlösungen explorativ ermittelt. Im Zuge der hierfür notwendigen Vorversuche stellte sich heraus, dass es mit allen getesteten Antikörpern nicht möglich ist, das BMAL1-Protein aus humanen MSH zu isolieren und per Western Blot nachzuweisen. Die Primärantikörper der Firmen Cell Signaling Technology, Abcam, Santa Cruz und Bio-Rad lieferten keine klaren Banden auf der zu erwartenden Höhe. Dabei wurden sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper getestet. Das SOD1-Protein sowie das Haushaltsprotein β -Aktin lassen sich sehr gut in den Proteinextrakten aus humanen MSH nachweisen und quantifizieren. Alle Gelbilder der SOD1- und β -Aktin-Western Blots sind im Anhang A14 dargestellt. Abbildung 17 zeigt exemplarisch eine Western Blot Membran mit dem SOD1-Protein (links) und zusätzlich β -Aktin (rechts).

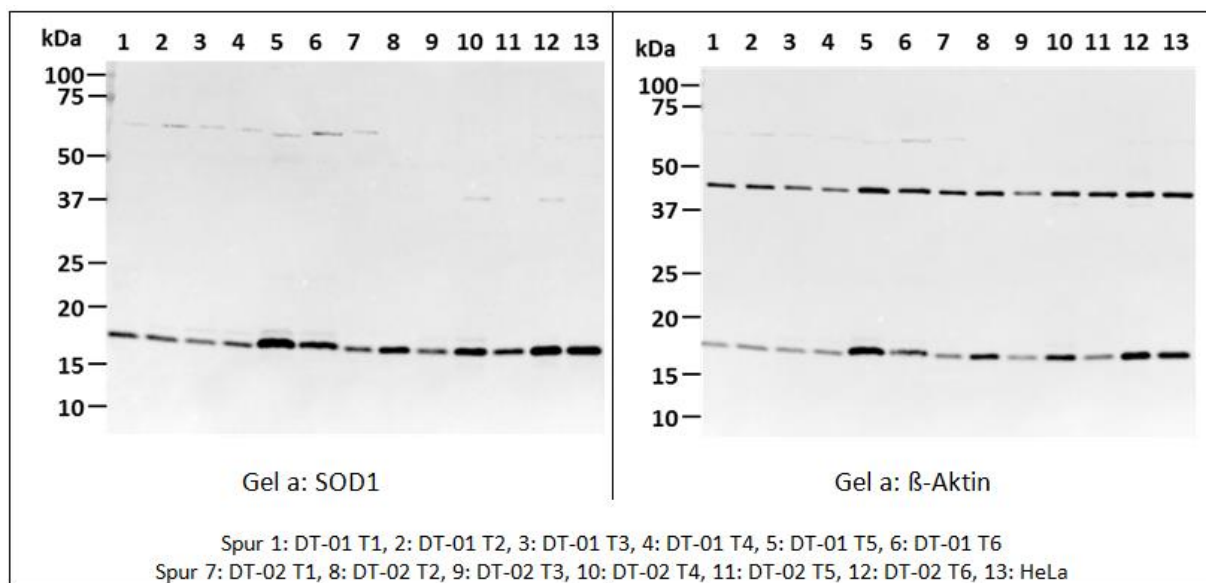


ABB. 17: EXEMPLARISCHES GELBILD EINES WESTERN BLOTS. Der linke Western Blot zeigt eine deutliche Proteinbande zwischen 15 und 20 Kilodalton (kDa), was der Größe des SOD1-Proteins (Monomer, 18 kDa) entspricht. Der rechte Blot zeigt dieselbe Membran, die zusätzlich eine deutliche Proteinbande zwischen 37 und 50 kDa zeigt, was der Größe von β -Aktin (42 kDa) entspricht.

7.2 DESKRIPTIVE MERKMALE DER PROBANDEN

7.2.1 ALTERSVERTEILUNG IM PROBANDENKOLLEKTIV

Das Probandenkollektiv dieser Studie setzt sich aus 21 jüngeren Frauen und 21 älteren Frauen zusammen (Tab. 13). Die jüngeren Frauen waren im Mittel 23,71 Jahre alt mit einer Standardabweichung von 2,31 Jahren. Die Altersspanne liegt dabei zwischen 20 und 28 Jahren. Das mittlere Alter der älteren Probandinnen betrug $66,81 \pm 5,67$ Jahre, wobei die größere Standardabweichung auf die größere Altersspanne von 60 bis 81 Jahren zurückzuführen sein dürfte.

TAB. 13: ALTERSVERTEILUNG DES PROBANDENKOLLEKTIVS

Altersgruppe		Alter (Jahre)
Jüngere Probandinnen	N	21
	Mittelwert	23,71
	Standardabweichung	2,305
	Minimum	20
	Maximum	28
Ältere Probandinnen	N	21
	Mittelwert	66,81
	Standardabweichung	5,671
	Minimum	60
	Maximum	81

N = Probandinnenanzahl

7.2.2 ANTHROPOMETRISCHE MERKMALE UND KÖRPERZUSAMMENSETZUNG

Die mittlere Körperhöhe der jüngeren Frauen betrug 1,70 m mit einer Standardabweichung von $\pm 0,07$ m, während sie bei den älteren Frauen bei $1,64 \pm 0,05$ m lag. Die Werte sind innerhalb der beiden Altersgruppen normalverteilt (Anhang A15). Die Körperhöhe der älteren Frauen ist sehr signifikant ($p = 0,001$) geringer als bei den jüngeren. Die jüngeren Probandinnen hatten ein mittleres Körpergewicht von $62,2 \pm 8,0$ kg und die älteren Probandinnen von $66,5 \pm 11,6$ kg. Dieser Unterschied ist nicht signifikant (n.s.) ($p = 0,176$). Das Körpergewicht der älteren Frauen lag somit im Mittel 4,3 kg über dem der jüngeren, was in Zusammenhang mit der geringeren mittleren Körperhöhe bei den älteren Probandinnen zu einem höheren BMI führte. Dieser betrug bei den jüngeren Probandinnen im Mittel $21,5 \pm 2,6$ kg/m², während er bei den älteren im Mittel $24,8 \pm 4,2$ kg/m² betrug. Auch der mittlere Tailen-Hüft-Index war bei den Älteren mit $0,845 \pm 0,058$ höher als bei den Jüngeren

mit $0,755 \pm 0,049$. Dabei unterscheiden sich BMI ($p = 0,004$) und Taillen-Hüft-Index ($p < 0,001$) sehr bzw. hoch signifikant zwischen den beiden Altersgruppen.

Die Bestimmung der Körperzusammensetzung zeigte, dass jüngere Probandinnen eine um 3,3 kg geringere Fettmasse sowie eine um 1,8 kg höhere Zellmasse aufwiesen als ältere Frauen (vgl. Tab. 14), wobei der Unterschied der Körperzellmasse statistisch signifikant ist ($p = 0,034$). Daraus ergab sich ein ebenfalls höherer Grundumsatz bei den jüngeren Probandinnen (55,2 kcal/Tag), der statistisch signifikant ist ($p = 0,037$). Die Jüngeren wiesen zudem mit 0,95 einen geringeren mittleren Index der Extrazellulären Masse im Verhältnis zur Körperzellmasse auf als die älteren Probandinnen mit einem Index von 1,15. Dieser Unterschied ist statistisch hoch signifikant ($p < 0,001$).

TAB. 14: ANTHROPOMETRISCHE KENNZEICHEN UND KÖRPERZUSAMMENSETZUNG BEI JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN SOWIE DEREN MITTELWERTVERGLEICHE

Variable	Jüngere Frauen (N=21)		Ältere Frauen (N=21)		Mittelwertvergleiche		
	M	SD	M	SD	t	u	p
Körperhöhe (cm)	170,06	6,50	163,69	5,15	-3,520	-	0,001
Körpergewicht (kg)	62,24	8,02	66,48	11,57	1,379	-	0,176
BMI (kg/m ²)	21,52	2,61	24,81	4,19	3,063	-	0,004
Taillen-Hüft-Index	0,76	0,05	0,84	0,06	5,392	-	<0,001
FM (kg)	18,34	5,28	21,67	8,58	1,513	-	0,140
TBW (L)	32,14	2,82	32,80	2,73	0,772	-	0,444
LBM (kg)	43,90	3,86	44,80	3,75	0,771	-	0,445
ECM (kg)	21,23	2,08	23,88	2,49	3,743	-	0,001
BCM (kg)	22,69	2,67	20,93	2,54	-2,190	-	0,034
ECM/BCM-Ratio	0,95	0,12	1,15	0,16	-	-3,890	<0,001
ECW (L)	11,94	1,92	12,77	2,13	1,330	-	0,191
ICW (L)	20,21	1,09	20,02	0,74	-0,662	-	0,512
ECW/ICW-Ratio	0,59	0,08	0,64	0,09	1,828	-	0,075
Grundumsatz (kcal/24 Std)	1333,81	85,17	1278,57	80,21	-2,164	-	0,037

N = Probandinnenanzahl, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, t = Prüfgröße des t-

Tests für unverbundene Stichproben, u = Prüfgröße des Mann-Whitney-U-Tests,

p = Irrtumswahrscheinlichkeit (signifikante Werte sind hervorgehoben),

BMI = Body-Mass-Index, FM = Fettmasse, TBW = Gesamtkörperwasser, LBM = Magermasse,

ECM = Extrazellulärmasse, BCM = Körperzellmasse, ECW = Extrazellulärwasser,

ICW = Intrazellulärwasser

7.2.3 VERTEILUNG DER CHRONOTYPEN

Unter Anwendung des D-MEQ Fragebogens wurden Morgen- und Abendpräferenzen der Probandinnen ermittelt (Tab. 15). Die Zuordnung zu Morgen-, Neutral- und Abendtypen darf mit dem Horne-Östberg Fragebogen nur bei jungen Probandinnen vorgenommen werden, da er für junge Erwachsene konzipiert wurde und für andere Altersgruppen die Punktwerte angeglichen werden müssten (Taillard *et al.* 2004). Deshalb werden hier die Punktwerte dargestellt. Ältere Probandinnen hatten dabei im Mittel mit $59,96 \pm 8,55$ Punkten eine höhere Morgenpräferenz als jüngere mit einem mittleren Punktwert von $54,69 \pm 8,46$ (Tab. 15, Abb. 18), wobei Spannweiten und Standardabweichungen nahezu identische Werte in beiden Altersgruppen zeigten. Der Unterschied zwischen den Punktwerten von jüngeren und älteren Frauen ist nicht signifikant ($t = 2,006, p = 0,052$). Für die Studie wurden vorzugsweise Morgen- und Neutraltypen gesucht, jedoch zeigte die Auswertung des D-MEQ, dass eine ältere Probandin tendenziell den Abendtypen zugeordnet werden muss. Von den jüngeren Probandinnen können 33,3 % den Morgentypen zugeordnet werden und die übrigen 66,7 % den Neutraltypen (Abb. 19).

TAB. 15: DESKRIPTIVE BEFUNDE ZUM CHRONOTYP NACH D-MEQ-FRAGEBOGEN BEI JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN

Altersgruppe		D-MEQ (Punkte)
Jüngere Frauen (N = 21)	Mittelwert	54,69
	Standardabweichung	8,46
	Minimum	42,00
	Maximum	71,00
Ältere Frauen (N = 21)	Mittelwert	59,96
	Standardabweichung	8,55
	Minimum	40,40
	Maximum	70,40

N = Probandinnenanzahl

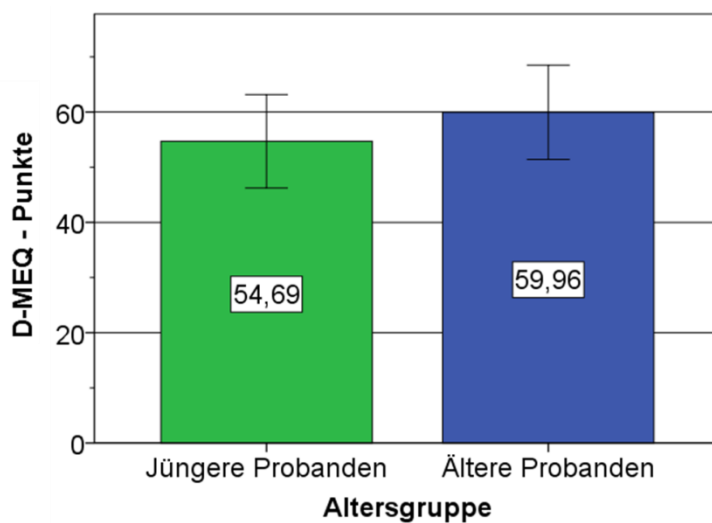


ABB. 18: PUNKTEZAHLEN IM DEUTSCHEN „MORNIGNESS-EVENIGNESS-QUESTIONNAIRE“ BEI 21 JÜNGEREN UND 21 ÄLTEREN FRAUEN. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

Altersgruppe: Jüngere Probanden

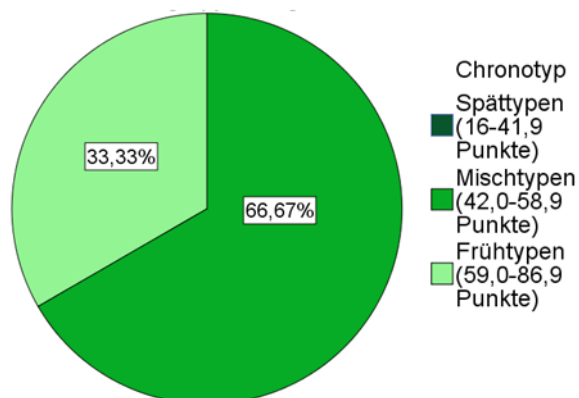


ABB. 19: VERTEILUNG VON MORGEN- UND NEUTRALTYPEN BEI 21 JÜNGEREN FRAUEN

7.2.4 SCHLAFQUALITÄT, TAGESSCHLÄFRIGKEIT UND NICKERCHEN

Die subjektiv empfundene Schlafqualität wurde retrospektiv mit dem PSQI-Fragebogen ermittelt. Die Probandinnen sollten nach Möglichkeit eine gute Schlafqualität haben, was im PSQI einem Punktwert von ≤ 5 entspricht. Bei den jungen Probandinnen lag der Punktwert im Mittel bei $4,2 \pm 2,1$ und bei den älteren Probandinnen bei $4,7 \pm 2,2$ (Tab. 16). Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant ($p = 0,435$). Obwohl alle Probandinnen in dem Prätest-Fragebogen eine gute Schlafqualität angegeben hatten, zeigt die Auswertung des

PSQI, dass insgesamt 10 Probandinnen eine schlechte Schlafqualität mit mehr als 5 Punkten aufwiesen. Davon betroffen waren vier jüngere und sechs ältere Frauen.

Der ESS-Fragebogen zeigt, dass die jüngeren Probandinnen mit $7,4 \pm 3,5$ Punkten eine höhere Tagesschläfrigkeit aufwiesen als die älteren mit $6,3 \pm 3,5$ Punkten (Tab. 16). Der Unterschied zwischen den mittleren Punktwerten der Tagesschläfrigkeit von jüngeren und älteren Probandinnen ist statistisch nicht signifikant ($p = 0,315$). Vier jüngere Probandinnen hatten Gesamtpunktwerte über 10 und gelten somit als tagesschläfrig. Bei den Älteren trifft dies nur auf drei Frauen zu.

Bei den jüngeren Probandinnen gaben vier an, regelmäßig tagsüber ein Nickerchen zu halten. Bei einer jüngeren Probandin kam dies nur gelegentlich vor. Die Dauer der Nickerchen variierte dabei zwischen 1 und 60 min und lag im Mittel bei $26,2 \pm 21,6$ min. Von den älteren Probandinnen hielten ebenfalls vier regelmäßig Nickerchen und zwei gelegentlich, wobei die Nickerchen zwischen 13 und 30 min dauerten. Dies entsprach im Mittel $22,2 \pm 6,6$ min.

TAB. 16: SCHLAFQUALITÄT UND TAGESSCHLÄFRIGKEIT BEI JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN SOWIE DEREN MITTELWERTVERGLEICHE

Variable	Jüngere Frauen (N=21)		Ältere Frauen (N=21)		Mittelwertvergleiche	
	M	SD	M	SD	t	p
Schlafqualität: PSQI-Punkte	4,19	2,11	4,71	2,19	0,788	0,435
Tagesschläfrigkeit: ESS-Punkte	7,43	3,47	6,33	3,50	-1,018	0,315

N = Probandinnenanzahl, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, t = Prüfgröße des t-Tests für unverbundene Stichproben, p = Irrtumswahrscheinlichkeit

7.2.5 LEBENSQUALITÄT UND STRESS

Bei dem Fragebogen zur Lebenszufriedenheit erreichten die älteren Probandinnen in allen acht Bereichen einen höheren Mittelwert als die jüngeren Probandinnen. Der Gesamtwert lag bei den älteren Frauen im Mittel bei $34,9 \pm 3,3$ Punkten und bei den jüngeren bei $30,5 \pm 4,1$ Punkten (Tab. 17, Abb. 20). Dieser Unterschied ist statistisch hoch signifikant ($p < 0,001$) (Tab. 17).

Die Ergebnisse des Fragebogens nach dem subjektiv empfundenen Stress der vergangenen vier Wochen zeigen ein umgekehrtes Ergebnis: Mit im Mittel $9,8 \pm 5,5$ Punkten lag der

empfundene Stress der älteren Probandinnen deutlich unter dem der jüngeren Probandinnen, die im Mittel $13,5 \pm 5,8$ Punkte erreichten (Tab. 17, Abb. 20). Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p = 0,041$) (Tab. 17). Die Standardabweichungen ähnelten sich mit 5,5 Punkten bei den älteren und 5,8 Punkten bei den jüngeren Probandinnen stark.

TAB. 17: STRESS UND LEBENSZUFRIEDENHEIT BEI JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN SOWIE DEREN MITTELWERTVERGLEICHE

Variable	Jüngere Frauen (N=21)		Ältere Frauen (N=21)		Mittelwert- vergleiche	
	M	SD	M	SD	t	p
Lebenszufriedenheit (Punkte)	30,48	4,11	34,90	3,33	3,839	<0,001
Stress (Punkte)	13,52	5,84	9,81	5,53	-2,117	0,041

N = Probandinnenanzahl, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, t = Prüfgröße des t-Tests für unverbundene Stichproben, p = Irrtumswahrscheinlichkeit (signifikante Werte sind hervorgehoben)

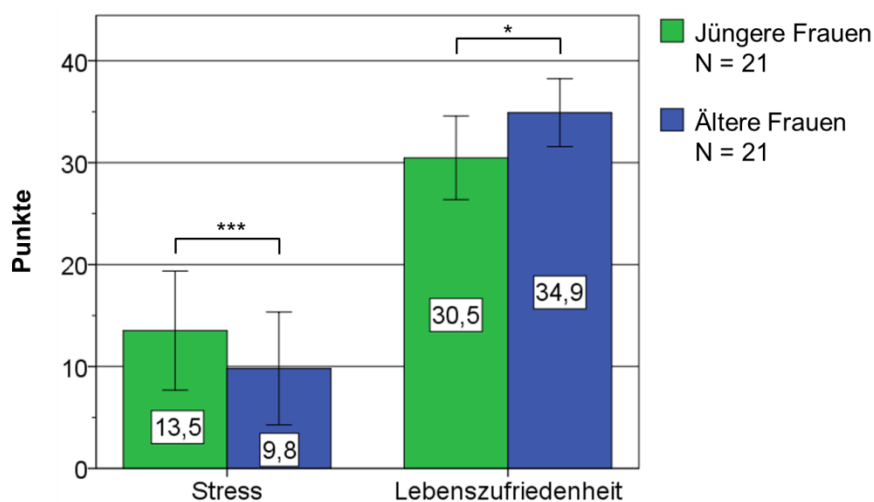


ABB. 20: STRESS UND LEBENSZUFRIEDENHEIT – mittlere Punktzahlen und Standardabweichungen aus den Fragebögen. Je höher die Punktzahlen, umso größer ist der subjektiv empfundene Stress bzw. die Lebenszufriedenheit. * $p < 0,050$, *** $p < 0,001$

7.2.6 LEBENSSTIL: GESUNDHEIT, ERNÄHRUNG, TAGESLICHT UND KÖRPERLICHE AKTIVITÄT

GESUNDHEIT

Die älteren Probandinnen beurteilten ihren Gesundheitszustand im Mittel positiver als jüngere Probandinnen (Abb. 21). Werden die Gesundheitszustände mit Zahlenwerten kodiert, d. h. „sehr schlecht“ mit 1, „schlecht“ mit 2, „mittel“ mit 3, „gut“ mit 4 und „sehr gut“ mit 5, dann erreichten die älteren Frauen im Mittel $4,3 \pm 0,6$ Punkte, während die jüngeren im Mittel nur $3,9 \pm 0,8$ Punkte erreichten (Tab. 18). Der Mittelwertunterschied zwischen den Altersgruppen ist jedoch nicht statistisch signifikant ($u = -1,887, p = 0,059$).

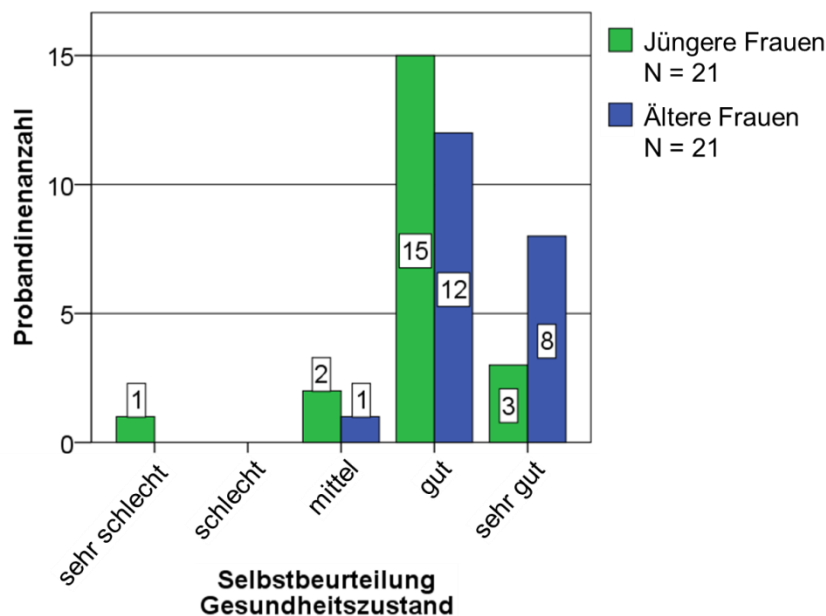


ABB. 21: VERTEILUNG DER SELBSTBEURTEILUNG DES GESUNDHEITZUSTANDES

Sowohl Schlafapnoe als auch grauer Star sind Merkmale des Alterns und wurden als solche mit erfasst. Der Apnoe-Fragebogen zeigt, dass nur eine jüngere sowie zwei ältere Probandinnen mit Punktwerten über 15 ziemlich wahrscheinlich an einem Schlafapnoe-Syndrom leiden oder litten. Bei 20 jüngeren und 19 älteren Probandinnen war eine Schlafapnoe bei Werten zwischen 0 und 14 hingegen unwahrscheinlich.

Keine der jüngeren Probandinnen hatte grauen Star oder eine Operation wegen selbigem. Bei sieben älteren Probandinnen wurde grauer Star diagnostiziert und bei sechs von ihnen wurde dieser an einem (zwei Frauen) oder beiden Augen (vier Frauen) operiert (Abb. 22).

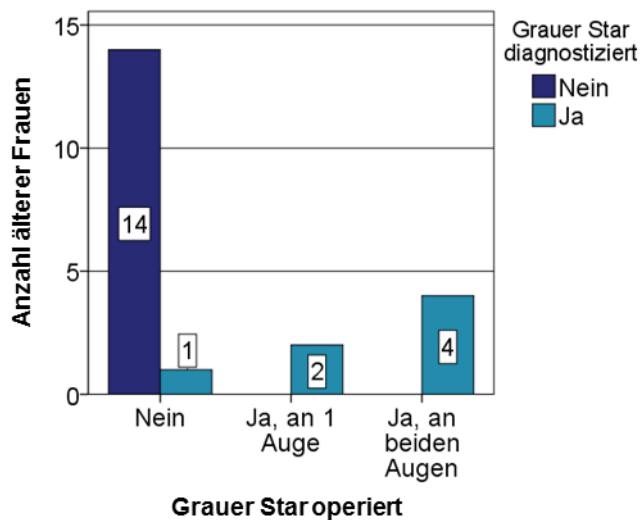


ABB. 22: GRAUER STAR ALS ALTERNASSOZIIERTE VERÄNDERUNG BEI 21 ÄLTEREN FRAUEN

ERNÄHRUNG

Der Allgemeine Fragebogen erfasst verschiedene Ernährungsgewohnheiten der Probandinnen, die sich auf OS- oder Melatoninwerte auswirken können. Die Ergebnisse sind in Tab. 18 und Abb. 23 dargestellt. Der Obst- und Gemüseverzehr wurde in Portionen pro Woche angegeben. Dabei entspricht eine Portion einer Handvoll, sodass z. B. ein mittelgroßer Apfel oder eine Orange einer Obstportion entspricht. Der Verzehr an Obst war in den beiden Altersgruppen mit im Mittel 8,7 Portionen pro Woche bei den älteren und 8,4 Portionen bei den jüngeren Probandinnen sehr ähnlich. Allerdings verzehrten die jüngeren Probandinnen mit im Mittel 10,2 Portionen pro Woche mehr Gemüse als die älteren mit 8,8 Portionen. Der Kaffee- und Schwarzteeconsum lag bei den älteren Probandinnen mit im Mittel 19,5 Tassen pro Woche deutlich über dem der jüngeren, die nur 6,0 Tassen Kaffee oder schwarzen Tee pro Woche tranken. Auch der Alkoholkonsum der älteren Gruppe war mit 2,7 Gläsern pro Woche höher als bei den jüngeren mit im Mittel 0,8 Gläsern. Insbesondere bei dem Konsum der Genussmittel Kaffee, schwarzer Tee und Alkohol waren hohe Standardabweichungen zu beobachten, denen große interindividuelle Unterschiede zwischen den Probandinnen zugrunde lagen. Dies galt in etwas abgeschwächtem Maße auch für den Verzehr von Obst und Gemüse. Die Unterschiede in Obst- ($p = 0,509$) und Gemüseverzehr ($p = 0,990$) sind zwischen den beiden Altersgruppen statistisch nicht signifikant, wohingegen der Kaffee-/Schwarztee- ($p < 0,001$) und der Alkoholkonsum ($p = 0,009$) sehr bzw. hoch signifikant unterschiedlich sind.

TAB. 18: GESUNDHEIT UND ERNÄHRUNGSGEWOHNHEITEN BEI JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN SOWIE DEREN MITTELWERTVERGLEICHE

Variable	Jüngere Frauen (N=21)		Ältere Frauen (N=21)		Mittelwert- vergleiche	
	M	SD	M	SD	u	p
Gesundheitszustand (Selbstbeurteilung)	3,90	0,83	4,33	0,58	-1,887	0,059
Obst (Portionen/Woche)	8,43	7,57	8,69	4,70	-0,660	0,509
Gemüse (Portionen/Woche)	10,19	7,42	8,76	4,68	-0,013	0,990
Kaffee/Schwarztee (Tassen/Woche)	5,98	5,65	19,52	8,54	-4,704	<0,001
Alkohol (Gläser/Woche)	0,80	0,85	2,74	2,96	-2,611	0,009

N = Probandinnenanzahl, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, u = Prüfgröße des Mann-Whitney-U-Tests, p = Irrtumswahrscheinlichkeit (signifikante Werte sind hervorgehoben)

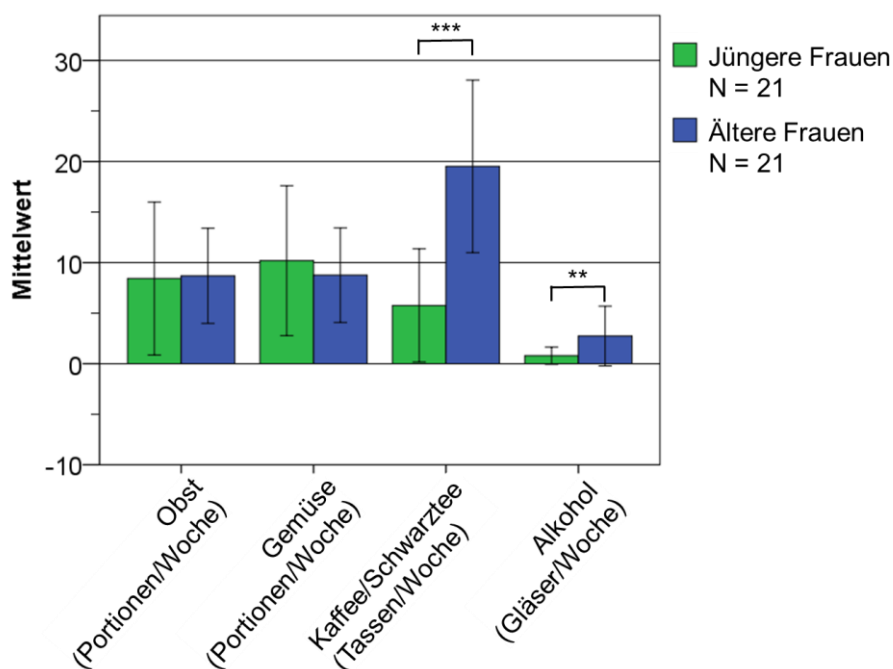


ABB. 23: ERNÄHRUNGSGEWOHNHEITEN VON JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen. ** p < 0,010, *** p < 0,001

ZEIT IM FREIEN UND KÖRPERLICHE AKTIVITÄT

Im allgemeinen Fragebogen wurde erfragt, wie viele Stunden die Probandinnen sich im Freien aufhalten. Während dieser Zeit sind sie durch das Tageslicht in erhöhtem Maße Blaulicht ausgesetzt, das sich in Abhängigkeit von der Tageszeit auf die abendliche und morgendliche Melatoninsynthese auswirken kann. Jüngere Frauen hielten sich an Arbeitstagen mit im Mittel $1,9 \pm 1,2$ Std etwas länger im Freien auf als ältere Frauen, bei denen es im Mittel $1,8 \pm 1,2$ Std waren. An freien Tagen kehrte sich dieses Verhältnis um, wobei beide Altersgruppen mehr Zeit im Freien verbrachten als an Berufstagen. Im Mittel verbrachten die jüngeren Frauen an freien Tagen $3,0 \pm 1,8$ Stunden im Freien, während es bei den Älteren im Mittel $3,1 \pm 1,8$ Std waren (Tab. 19, Abb. 24). Die Unterschiede sind jedoch statistisch nicht signifikant (Tab. 19).

Auch Bewegung und körperliche Aktivität können die abendliche Melatoninsynthese sowie zusätzlich die SOD1-Aktivität beeinflussen. Die jüngeren Probandinnen schätzten sich dabei mit einem mittleren Punktwert von $3,4 \pm 0,6$ etwas stärker körperlich aktiv ein als die älteren mit im Mittel $3,2 \pm 0,9$ Punkten. Die Anzahl der Sporteinheiten lag bei den Jüngeren mit mittleren $2,74 \pm 1,12$ nur geringfügig über den Älteren mit im Mittel $2,69 \pm 1,97$. Im Gegensatz dazu lag die Anzahl an Sportstunden pro Woche bei den jüngeren Probandinnen mit mittleren $4,6 \pm 3,1$ deutlich über den älteren mit mittleren $2,9 \pm 2,2$ Stunden. Die einzelnen Bewegungseinheiten der jüngeren Frauen waren folglich länger als bei den älteren. Die beschriebenen Unterschiede sind jedoch alle statistisch nicht signifikant (Tab. 19).

TAB. 19: ZEITRÄUME IM FREIEN UND KÖRPERLICHE AKTIVITÄT VON JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN SOWIE DEREN MITTELWERTVERGLEICHE

Variable	Jüngere Frauen (N=21)		Ältere Frauen (N=21)		Mittelwert- vergleiche		
	M	SD	M	SD	t	u	p
Zeitraum im Freien – Berufszeit (Std)	1,91	1,20	1,75 ^{a)}	1,17 ^{a)}	-0,345	-	0,735
Zeitraum im Freien – Freizeit (Std)	2,99	1,78	3,09	1,81	0,417	-	0,679
Körperlicher Aktivitätsgrad	3,43	0,60	3,24	0,94	-	-0,780	0,435
Sport pro Woche (Mal/Woche)	2,74	1,12	2,69	1,97	-0,096	-	0,924
Sport pro Woche (Std/Woche)	4,62	3,08	2,90	2,22	-	-1,713	0,087

N = Probandinnenanzahl, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, ^{a)} N = 9, t = Prüfgröße des t-Tests für unverbundene Stichproben, u = Prüfgröße des Mann-Whitney-U-Tests, p = Irrtumswahrscheinlichkeit

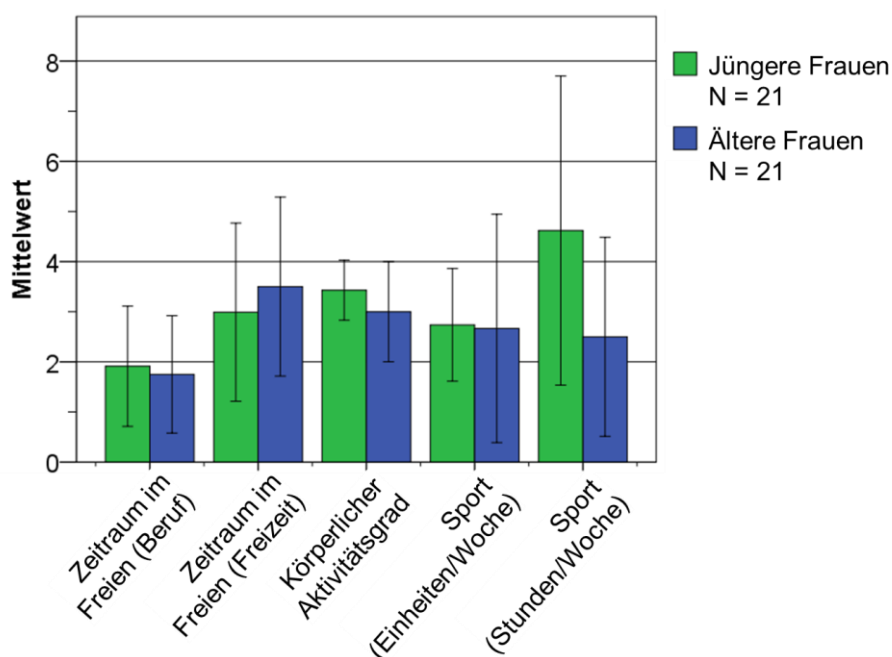


ABB. 24: ZEIT IM FREIEN UND SPORTGEWOHNHEITEN VON JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

7.2.7 ART DES BERUFS

Der allgemeine Fragebogen erfasst auch die Art des ausgeübten Berufes bzw. bei den Älteren gegebenenfalls den Ruhestand. Von den 21 jüngeren Probandinnen waren 19 Studierende (90,5 %) und 2 Angestellte (9,5 %). Bei den 21 älteren Frauen waren 12 Frauen im Ruhestand (57,1 %), wohingegen 9 noch einen Beruf ausübten. Von diesen waren fünf Angestellte (23,8 %), je eine Beamtin (4,8 %) und eine selbstständig (4,8 %) und zwei übten in ihrem Ruhestand noch eine selbstständige Tätigkeit aus (9,5 %).

7.3 CHARAKTERISIERUNG UND VERGLEICH CIRCADIANER MERKMALE ZWISCHEN ALTERSGRUPPEN

7.3.1 KÖRPERKERNTemperatur UND PERIPHERE HAUTTEMPERATUR

KÖRPERKERNTemperatur

Die oral gemessene Körperkerntemperatur zeigt bei jüngeren und älteren Frauen eine deutliche circadiane Rhythmik (Tab. 20, Abb. 25). Von der ersten Messung um 08 Uhr nimmt die Temperatur bei beiden Altersgruppen kontinuierlich bis um 16 Uhr zu und nimmt zum Abend sowie zur Nacht hin ab. Das Temperaturminimum wurde bei den Jüngeren mit 36,43° C um 04 Uhr nachts gemessen und bei den Älteren mit 35,99° C um 24 Uhr nachts. Die Temperaturmaxima lagen bei beiden Probandengruppen um 16 Uhr mit 36,75° C bei den Jüngeren und 36,58° C bei den Älteren. Zu jedem Messzeitpunkt lag die mittlere Körperkerntemperatur der jüngeren Frauen höher als bei den älteren. Die Temperaturunterschiede zwischen den Altersgruppen sind zu allen sechs Messzeitpunkten statistisch signifikant (Tab. 20, Abb. 25).

TAB. 20: KÖRPERKERNTemperatur ORAL (° C) BEI JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN SOWIE DEREN MITTELWERTVERGLEICHE

Uhrzeit	Jüngere Frauen (N=21)		Ältere Frauen (N=21)		Mittelwertvergleiche	
	M	SD	M	SD	t	p
08:00	36,59	0,27	36,26	0,23	-4,216	<0,001
12:00	36,69	0,30	36,44	0,30	-2,643	0,012
16:00	36,75	0,27	36,58	0,22	-2,181	0,035
20:00	36,68	0,25	36,46	0,20	-3,189	0,003
00:00	36,47	0,24	35,99	0,23	-6,682	<0,001
04:00	36,43	0,34	36,12	0,28	-3,130	0,003

N = Probandinnenanzahl, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, t = Prüfgröße des t-Tests, p = Irrtumswahrscheinlichkeit (signifikante Werte sind hervorgehoben)

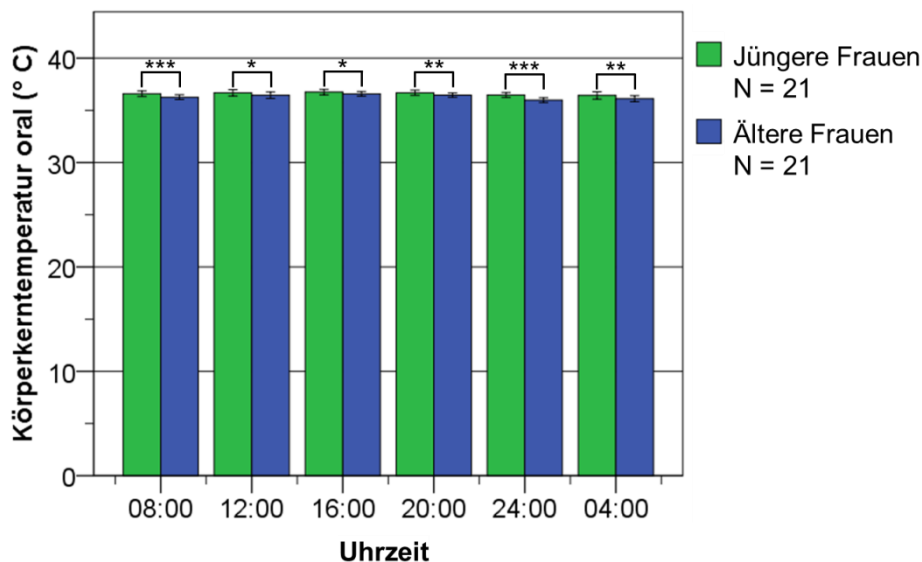


ABB. 25: KÖRPERKERNTEMPERATUR ORAL (° C) BEI JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen. * $p < 0,050$, ** $p < 0,010$, *** $p < 0,001$

Um zu testen, ob sich die KKT-Mittelwerte über die sechs Messzeitpunkte innerhalb der beiden Altersgruppen voneinander unterscheiden, wurde eine Varianzanalyse für Messwiederholungen durchgeführt. Diese zeigt, dass sich die Messwerte im Tagesverlauf sowohl bei den jüngeren ($f = 10,040$, $p < 0,001$) als auch bei den älteren Frauen ($f = 25,429$, $p < 0,001$) signifikant voneinander unterscheiden.

Um zu testen, zwischen welchen Messzeitpunkten die KKT innerhalb der Altersgruppen signifikant voneinander verschieden war, wurden t-Teste für verbundene Stichproben durchgeführt. Sowohl in der jüngeren als auch der älteren Altersgruppe lassen sich zahlreiche signifikante Unterschiede zwischen den Temperaturen zu den einzelnen Messzeitpunkten beobachten (Tab. 21). Dies weist daraufhin, dass die hier beobachteten Temperaturunterschiede im Tagesverlauf nicht zufällig sind.

TAB. 21: VERGLEICH DER KÖRPERKERNTEMPERATURDATEN BEI JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN MITTELS T-TEST FÜR VERBUNDENE STICHPROBEN

Jüngere Frauen (N = 21)										
Uhrzeit	08:00		12:00		16:00		20:00		24:00	
	t	p	t	p	t	p	t	p	t	p
12:00	-1,852	0,079	-	-	-	-	-	-	-	-
16:00	-3,156	0,005	-1,047	0,308	-	-	-	-	-	-
20:00	-2,050	0,054	0,143	0,888	1,699	0,105	-	-	-	-
24:00	2,635	0,016	3,254	0,004	4,728	<0,001	4,025	0,001	-	-
04:00	2,726	0,013	3,144	0,005	4,643	<0,001	3,586	0,002	0,994	0,332
Ältere Frauen (N = 21)										
Uhrzeit	08:00		12:00		16:00		20:00		24:00	
	t	p	t	p	t	p	t	p	t	p
12:00	-2,960	0,008	-	-	-	-	-	-	-	-
16:00	-4,982	<0,001	-2,354	0,029	-	-	-	-	-	-
20:00	-3,498	0,002	-0,309	0,760	2,877	0,009	-	-	-	-
24:00	4,987	<0,001	5,698	<0,001	9,132	<0,001	9,135	<0,001	-	-
04:00	2,238	0,037	3,851	0,001	6,319	<0,001	5,030	<0,001	-2,136	0,045

N = Probandinnenanzahl, t = Prüfgröße des t-Tests für verbundene Stichproben, p = Irrtumswahrscheinlichkeit (signifikante Werte sind hervorgehoben)

HAUTTEMPERATUR

Die periphere Hauttemperatur, die am Versuchstag mittels eines Temperatursensors am Fußknöchel gemessen und dann gemittelt wurde, lag zu jedem Messzeitpunkt unter der Körperkerntemperatur. Eine tageszeitliche Schwankung mit einem Temperaturanstieg vom Morgen zum Nachmittag und einem abendlichen -abfall ließ sich deutlich beobachten (Tab. 22, Abb. 26). Das Maximum wurde nach erneutem Anstieg in der zweiten Nachthälfte erreicht und betrug um 04 Uhr bei den Jüngeren im Mittel 33,94° C und bei den Älteren 33,53° C. Das Temperaturminimum lag bei den jüngeren Frauen mit 28,79° C um 20 Uhr, während es bei den älteren mit 29,78° C um 08 Uhr morgens lag. Die mittleren Temperaturunterschiede zwischen den beiden Altersgruppen sind dabei nur um 20 Uhr (p = 0,010) und um 04 Uhr (p = 0,036) statistisch signifikant (Abb. 26, Tab. 22).

TAB. 22: PERIPHERE HAUTTEMPERATUR AM FUß (° C) BEI JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN SOWIE DEREN MITTELWERTVERGLEICHE

Uhrzeit	Jüngere Frauen			Ältere Frauen			Mittelwertvergleiche		
	N	M	SD	N	M	SD	t	u	p
08:00	21	30,59	1,46	20	29,78	1,63	-1,662	-	0,105
12:00	21	30,37	2,32	21	30,88	2,03	0,764	-	0,450
16:00	21	31,08	2,12	21	31,44	2,27	-	-0,377	0,706
20:00	21	28,79	1,83	21	30,51	2,24	2,722	-	0,010
24:00	21	33,03	2,05	21	32,32	1,55	-	-1,799	0,072
04:00	21	33,94	1,05	21	33,53	0,78	-	-2,102	0,036

N = Probandinnenanzahl, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, t = Prüfgröße des t-Tests, u = Prüfgröße des Mann-Whitney-U-Tests, p = Irrtumswahrscheinlichkeit (signifikante Werte sind hervorgehoben)

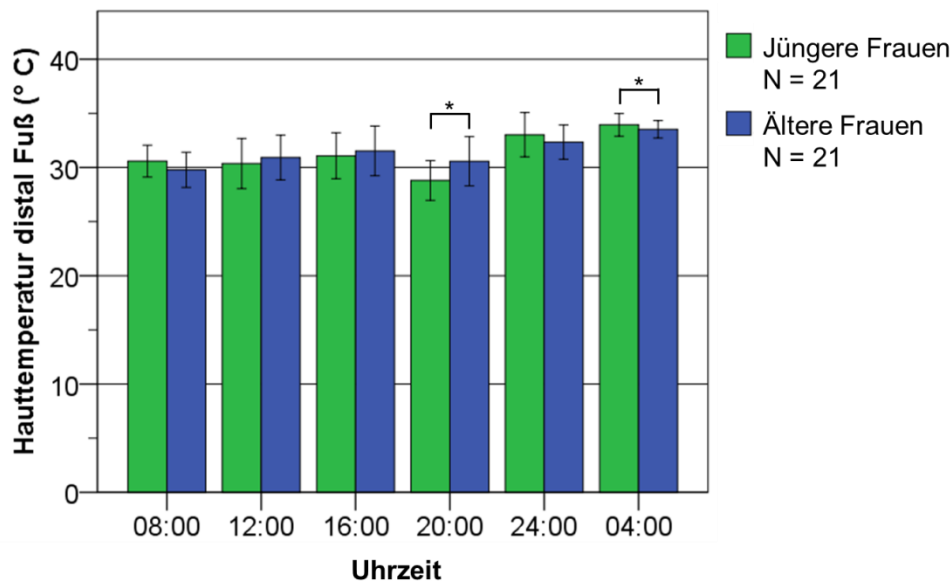


ABB. 26: PERIPHERE HAUTTEMPERATUR AM FUß (° C) JÜNGERER UND ÄLTERER FRAUEN. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen. * p < 0,050

Die Unterschiede der sechs Messwerte im Tagesverlauf sind innerhalb beider Altersgruppen statistisch hoch signifikant (Friedmantest: jüngere Frauen (N = 21): p < 0,001, ältere Frauen (N = 20): p < 0,001). Tabelle 23 zeigt, zu welchen Zeitpunkten signifikante Unterschiede zwischen den Messwerten bei jüngeren und älteren Frauen bestehen. In beiden Altersgruppen finden sich zahlreiche sehr und hoch signifikante Unterschiede zwischen den Werten der einzelnen Messzeitpunkte.

TAB. 23: VERGLEICH DER HAUTTEMPERATURDATEN BEI JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN MITTELS T-TEST FÜR VERBUNDENEN STICHPROBEN UND WILCOXON-TEST

Jüngere Frauen (N=21)										
Uhrzeit	08:00		12:00		16:00		20:00		24:00	
	t/Z	p	t/Z	p	t/Z	p	Z	p	Z	p
12:00	0,554	0,586	-	-	-	-	-	-	-	-
16:00	-1,375	0,184	-1,990	0,060	-	-	-	-	-	-
20:00	5,961	<0,001	-4,379	<0,001	6,598	<0,001	-	-	-	-
24:00	-3,563	<0,001	-3,493	<0,001	-2,659	0,008	-3,981	<0,001	-	-
04:00	-3,981	<0,001	-4,015	<0,001	-3,841	<0,001	-4,015	<0,001	-1,605	0,108
Ältere Frauen (N=21)										
Uhrzeit	08:00		12:00		16:00		20:00		24:00	
	t/Z	p	t/Z	p	Z	p	t	p	t	p
12:00	-2,746	0,013	-	-	-	-	-	-	-	-
16:00	-2,950	0,003	-1,232	0,218	-	-	-	-	-	-
20:00	-1,784	0,090	0,726	0,476	-2,347	0,019	-	-	-	-
24:00	-6,429	<0,001	-3,014	0,007	-1,234	0,217	-3,203	0,004	-	-
04:00	-11,102	<0,001	-5,862	<0,001	-3,285	0,001	-5,887	<0,001	-3,565	0,002

N = Probandinnenanzahl, t = Prüfgröße des t-Tests für verbundene Stichproben, Z = Prüfgröße des Wilcoxon-Tests (blau), p = Irrtumswahrscheinlichkeit (signifikante Werte sind hervorgehoben)

HAUTTEMPERATUR – COSINORANALYSE

Vergleicht man die Temperaturdaten der jüngeren und älteren Frauen miteinander, zeigen sich neben dem höheren Tagesmittel, dem höheren Maximum und dem niedrigeren Minimum bei den jüngeren Frauen weitere Unterschiede zwischen den Altersgruppen (Tab. 24). So traten Minimum und Maximum bei den jüngeren Frauen später auf als bei den älteren. Zudem waren Mesor, Amplitude und Akrophase bei den Älteren erniedrigt. Allerdings sind die Unterschiede zwischen den Altersgruppen ausschließlich beim Maximum (Peak) statistisch signifikant (Tab. 24).

TAB. 24: CIRCADIANE MERKMALE DER PERIPHEREN HAUTTEMPERATUR BEI JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN SOWIE DEREN MITTELWERTVERGLEICHE

Variable	Jüngere Frauen			Ältere Frauen			Mittelwertvergleiche		
	N	M	SD	N	M	SD	t	u	p
Tagesmittel (° C)	21	30,62	1,73	21	30,92	1,60	0,569	-	0,572
Maximum (Peak) (° C)	21	35,98	0,62	21	35,18	0,84	-3,489	-	0,001
Uhrzeit des Maximums	21	04:46	123,65 ^{a)}	21	03:15	229,38 ^{a)}	-	-1,711	0,087
Minimum (Nadir) (° C)	21	28,09	2,06	21	28,69	1,78	1,006	-	0,320
Uhrzeit des Minimums	21	15:36	292,66 ^{a)}	21	13:42	322,13 ^{a)}	-	-1,660	0,097
Mesor (° C)	21	31,94	1,28	21	31,91	1,19	-0,081	-	0,936
Amplitude (° C)	21	2,61	1,20	20	2,08	1,07	-1,475	-	0,148
Akrophase (Uhrzeit)	21	03:46	64,03 ^{a)}	20	02:54	117,90 ^{a)}	-1,738	-	0,093

N = Probandinnenanzahl, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, ^{a)} Angabe in Minuten, t = Prüfgröße des t-Tests, u = Prüfgröße des Mann-Whitney-U-Tests, p = Irrtumswahrscheinlichkeit (signifikante Werte sind hervorgehoben)

Im direkten Vergleich der peripheren Hauttemperaturkurven von jüngeren und älteren Frauen über den Versuchszeitraum ist eine Abflachung der Kurve bei den älteren Frauen deutlich erkennbar (Abb. 27). Infolgedessen liegen Minima und Maxima näher beieinander als bei den jüngeren Frauen, die einen stärker ausgeprägten Kurvenverlauf aufweisen. Durch die Abflachung der Kurve besonders am Abend, entfällt bei der älteren Gruppe um 20 Uhr das bei den Jüngeren beobachtete abendliche Minimum, sodass das Minimum der Älteren erst am Morgen auftritt. Im Gegensatz zur Körperkerntemperatur, lag die mittlere periphere Hauttemperatur der älteren Frauen zu drei Zeitpunkten – von 12 Uhr bis einschließlich 20 Uhr – über der mittleren Temperatur der jüngeren Frauen.

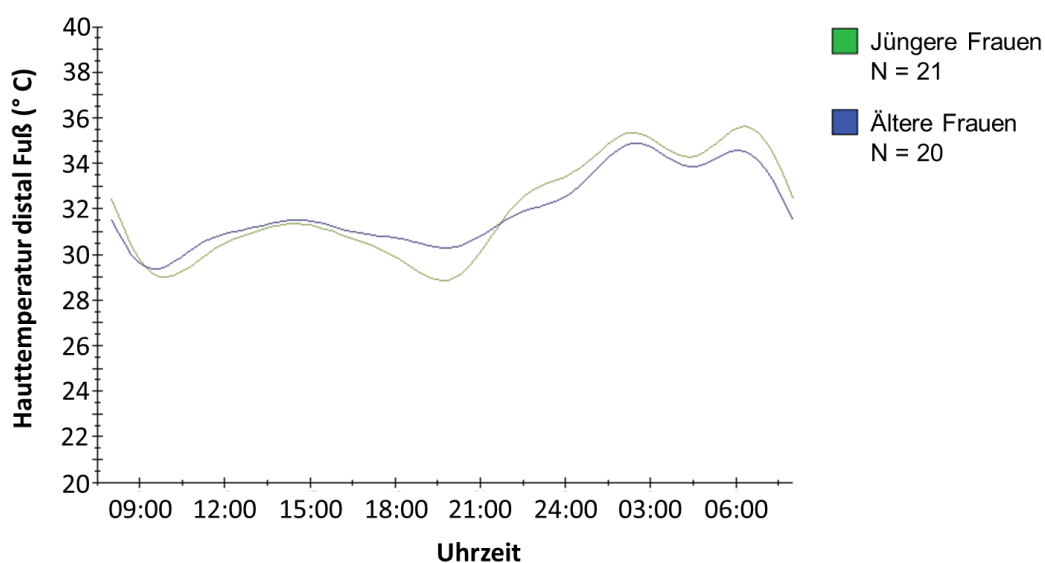


ABB. 27: CIRCADIANE RHYTHMIK DER PERIPHEREN HAUTTEMPERATUR VON 21 JÜNGEREN UND 20 ÄLTEREN PROBANDINNEN. Angegeben ist der Mittelwert der jeweiligen Altersgruppe.

7.3.2 *hBMAL1*-GEN, *hSOD1*-GEN UND SOD1-PROTEIN

hBMAL1

Die mRNA-Konzentration wurde mittels qRT-PCR bestimmt und mit dem Haushaltsgen *h36B4* ins Verhältnis gesetzt. Für das Uhrengen *hBmal1* zeigt die mRNA-Konzentration eine tageszeitliche Rhythmik (Tab. 25, Abb. 28). Beide Altersgruppen haben im Mittel niedrige Werte am Morgen, ein kleines Zwischenhoch am Mittag (jüngere Probandinnen) bzw. Nachmittag (ältere Probandinnen) und einen klaren Anstieg zum Peak in der Nacht. Bei beiden Altersgruppen liegt das Maximum um 04 Uhr nachts und das Minimum um 08 Uhr morgens. Zu allen Zeitpunkten liegt die *hBmal1*-mRNA-Konzentration bei den älteren Frauen höher als bei den jüngeren (Tab. 25, Abb. 28). Dabei sind die Unterschiede zwischen den beiden Altersgruppen um 08 ($p = 0,045$) sowie um 16 Uhr ($p = 0,024$) statistisch signifikant.

TAB. 25: *hBMAL1/h36B4*-RATIO (GEN) BEI JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN SOWIE DEREN MITTELWERTVERGLEICHE

Uhrzeit	Jüngere Frauen			Ältere Frauen			Mittelwertvergleiche		
	N	M	SD	N	M	SD	t	u	p
08:00	12	0,78	0,48	15	1,29	0,86	-	-2,001	0,045
12:00	10	1,33	0,91	13	1,36	1,02	-	-0,124	0,901
16:00	7	0,80	0,46	13	1,72	0,82	-	-2,258	0,024
20:00	7	1,37	0,61	11	1,61	0,85	0,701	-	0,494
24:00	8	2,09	1,22	14	2,61	1,04	1,016	-	0,328
04:00	14	2,31	2,08	17	3,35	2,01	-	-1,954	0,052

N = Probandinnenanzahl, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, t = Prüfgröße des t-Tests, u = Prüfgröße des Mann-Whitney-U-Tests, p = Irrtumswahrscheinlichkeit (signifikante Werte sind hervorgehoben)

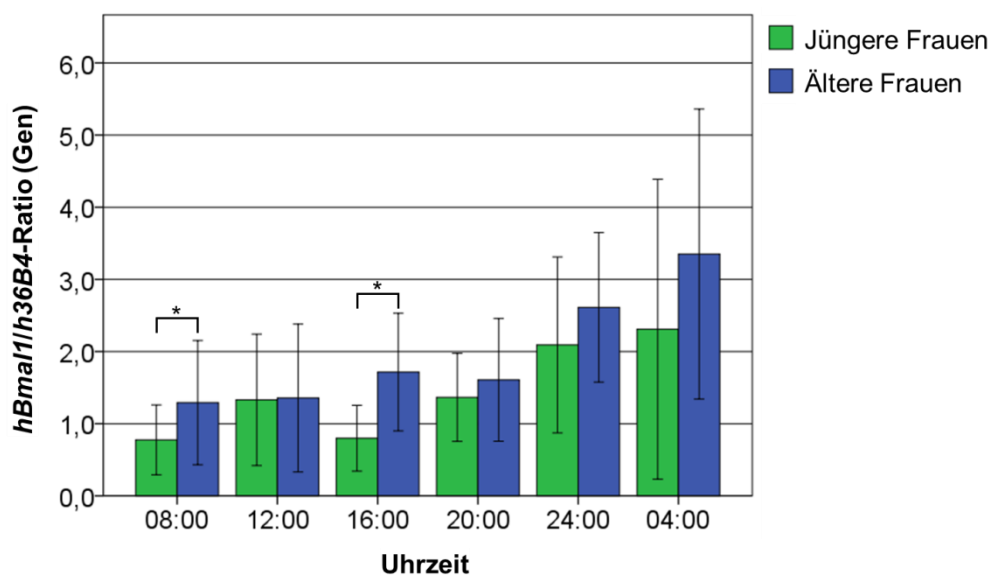


ABB. 28: *hBMAL1/h36B4*-RATIO (GEN) BEI JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen. * $p < 0,050$

Im Tagesverlauf sind die Unterschiede innerhalb der Altersgruppen zwischen den Messzeitpunkten signifikant verschieden (Tab. 26). Bei den jüngeren Frauen bestehen im Tagesverlauf signifikante Unterschiede zwischen der *hBmal1*-Expression um 08 und 04 Uhr (Wilcoxon: $p = 0,008$) sowie zwischen den Werten um 16 Uhr und 20 (Wilcoxon: $p = 0,028$) bzw. 04 (Wilcoxon: $p = 0,043$) Uhr. In der älteren Gruppe bestehen teils sehr signifikante Unterschiede zwischen der Uhrengenenexpression um 08 Uhr und 16 (Wilcoxon: $p = 0,028$), 24 (Wilcoxon: $p = 0,005$) und 04 (Wilcoxon: $p = 0,005$) Uhr. Die Unterschiede bei den älteren

zwischen 12 Uhr und 24 (Wilcoxon: $p = 0,003$) sowie 04 (Wilcoxon: $p = 0,002$) Uhr sind ebenfalls sehr signifikant.

TAB. 26: VERGLEICH DER *hBMAL1*-RATIOS BEI JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN MITTELS T-TEST FÜR VERBUNDENEN STICHPROBEN UND WILCOXON-TEST

Jüngere Frauen														
Uhrzeit	08:00			12:00			16:00			20:00			24:00 ^{a)}	
	N	Z	p	N	Z	p	N	Z	p	N	t/Z	p	Z	p
12:00	8	-1,540	0,123	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16:00	4	-0,730	0,465	6	-1,782	0,075	-	-	-	-	-	-	-	-
20:00	4	-1,826	0,068	5	-0,405	0,686	6	-2,201	0,028	-	-	-	-	-
24:00	6	-1,787	0,074	5	-0,405	0,686	3	-1,604	0,109	2	-0,659	0,629	-	-
04:00	9	-2,668	0,008	8	-1,893	0,058	7	-2,028	0,043	7	-0,169	0,866	-1,014	0,310
Ältere Frauen														
Uhrzeit	08:00			12:00			16:00			20:00			24:00 ^{b)}	
	N	Z	p	N	Z	p	N	t	p	N	t	p	t	p
12:00	13	-0,392	0,695	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16:00	12	-2,197	0,028	11	-1,646	0,100	-	-	-	-	-	-	-	-
20:00	10	-0,866	0,386	9	-1,244	0,214	11	0,655	0,527	-	-	-	-	-
24:00	13	-2,797	0,005	11	-2,934	0,003	10	-2,782	0,021	10	-2,491	0,034	-	-
04:00	14	-2,794	0,005	12	-3,059	0,002	11	-3,060	0,012	9	-3,057	0,016	-0,545	0,596

N = Probandinnenanzahl, t = Prüfgröße des t-Tests für verbundene Stichproben, Z = Prüfgröße des Wilcoxon-Tests (blau), p = Irrtumswahrscheinlichkeit (signifikante Werte sind hervorgehoben), ^{a)} N = 7, ^{b)} N = 13

hSOD1

Die mRNA für die antioxidative SOD1 variiert über den Tagesverlauf. Die niedrigsten *hSod1*-mRNA-Konzentrationen werden bei beiden Altersgruppen um 08 Uhr morgens detektiert (Tab. 27, Abb. 29). Bei den jüngeren Probandinnen ist ab morgens ein kontinuierlicher Anstieg bis zum Peak in der Nacht zu beobachten. Bei den Älteren tritt am Nachmittag ein Zwischenhoch auf, das bis 20 Uhr wieder abklingt, gefolgt von einem erneuten Anstieg bis 24 Uhr. Die größte Menge an *hSod1*-mRNA wird bei beiden Altersgruppen nachts nachgewiesen. Das Maximum liegt bei den älteren Probandinnen bei 24 Uhr. Bei den Jüngeren werden gleich hohe Konzentrationen um 24 und 04 Uhr gemessen, sodass der Peak vermutlich zwischen diesen beiden Zeitpunkten liegt. Zu allen Zeitpunkten – außer um 20 Uhr – ist die Konzentration an *hSod1*-mRNA bei den älteren Frauen im Mittel höher als bei den jüngeren (Tab. 27, Abb. 29). Diese Unterschiede zwischen den Altersgruppen sind jedoch statistisch nicht signifikant (Tab. 27).

TAB. 27: *hSOD1/h36B4*-RATIO (GEN) BEI JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN SOWIE DEREN MITTELWERTVERGLEICHE

Uhrzeit	Jüngere Frauen			Ältere Frauen			Mittelwertvergleiche		
	N	M	SD	N	M	SD	t	u	p
08:00	15	0,79	0,73	15	0,87	0,50	-	-0,954	0,340
12:00	14	0,81	0,43	11	1,01	0,56	-	-1,013	0,311
16:00	8	1,14	0,66	14	1,70	0,79	1,772	-	0,094
20:00	10	1,32	0,67	11	1,28	0,38	-0,147	-	0,885
24:00	9	1,73	0,71	14	3,19	2,45	-	-1,701	0,089
04:00	13	1,73	1,03	17	2,17	1,03	1,146	-	0,262

N = Probandinnenanzahl, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, t = Prüfgröße des t-Tests, u = Prüfgröße des Mann-Whitney-U-Tests, p = Irrtumswahrscheinlichkeit

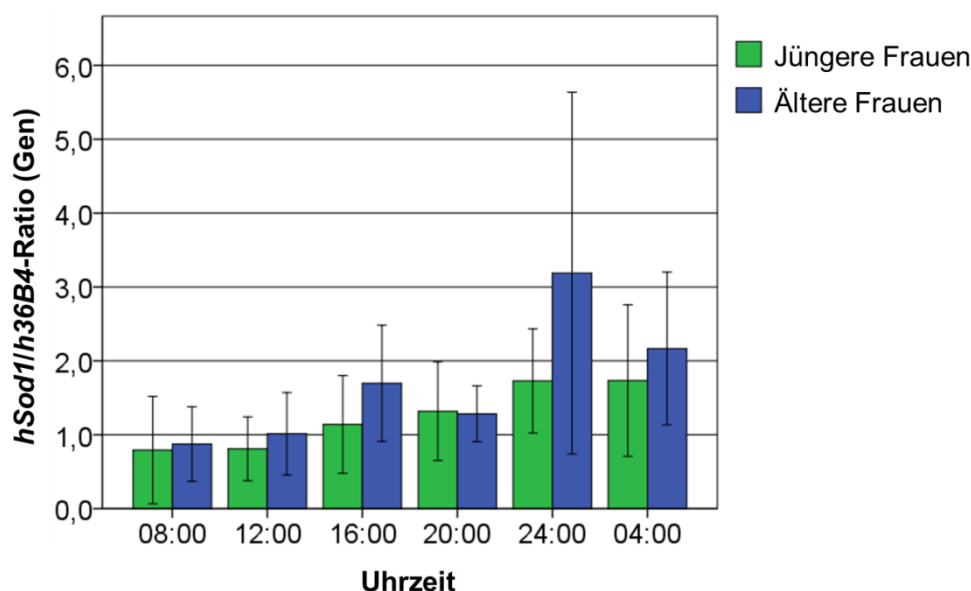


ABB. 29: *hSOD1/h36B4*-RATIO (GEN) BEI JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

Betrachtet man den eingangs bereits beschriebenen Tagesverlauf der *hSod1*-Konzentration innerhalb der beiden Altersgruppen und prüft diesen auf Unterschiede, lassen sich zu verschiedenen Uhrzeiten statistisch signifikante Unterschiede beobachten (Tab. 28). Bei den jüngeren Frauen unterscheiden sich die Messwerte zwischen 12 und 16, 20, 24 und 04 Uhr signifikant voneinander. In der älteren Gruppe bestehen signifikante Unterschiede zwischen der *hSod1*-Expression um 08 Uhr und um 16, 20 und 04 Uhr. Signifikante Unterschiede bestehen zudem zwischen 12 Uhr und 16, 24 sowie 04 Uhr. Dasselbe gilt für die Werte

zwischen 24 Uhr und 04 Uhr. Auch zwischen 20 und 04 Uhr besteht ein signifikanter Unterschied bei den Älteren.

TAB. 28: VERGLEICH DER *hSOD1*-RATIOS BEI JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN MITTELS T-TEST FÜR VERBUNDENEN STICHPROBEN UND WILCOXON-TEST

Jüngere Frauen														
Uhrzeit	08:00			12:00			16:00			20:00			24:00 ^{a)}	
	N	t/Z	p	N	t	p	N	t	p	N	t	p	t	p
12:00	13	-0,105	0,917	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16:00	7	-0,507	0,612	8	-2,373	0,049	-	-	-	-	-	-	-	-
20:00	9	-1,362	0,173	9	-2,016	0,079	8	-0,588	0,575	-	-	-	-	-
24:00	8	-1,260	0,208	8	-3,264	0,014	6	-1,260	0,263	6	-1,768	0,137	-	-
04:00	11	-1,689	0,091	10	-2,381	0,041	7	-1,106	0,311	8	-1,214	0,264	0,205	0,843
Ältere Frauen														
Uhrzeit	08:00			12:00			16:00			20:00			24:00 ^{b)}	
	N	t/Z	p	N	Z	p	N	t/Z	p	N	t/Z	p	Z	p
12:00	11	-0,978	0,328	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16:00	13	-3,608	0,004	11	-2,312	0,021	-	-	-	-	-	-	-	-
20:00	10	-2,568	0,030	8	-1,540	0,123	10	1,969	0,080	-	-	-	-	-
24:00	13	-3,111	0,002	11	-2,845	0,004	13	-0,574	0,566	11	-0,713	0,476	-	-
04:00	15	-5,699	<0,001	11	-2,756	0,006	13	-2,074	0,060	11	-2,539	0,029	-2,068	0,039

N = Probandinnenanzahl, t = Prüfgröße des t-Tests für verbundene Stichproben, Z = Prüfgröße des Wilcoxon-Tests (blau), p = Irrtumswahrscheinlichkeit (signifikante Werte sind hervorgehoben), ^{a)} N = 8, ^{b)} N = 14

SOD1-PROTEIN

Die Konzentration des SOD1-Proteins zeigte eine ausgeprägte circadiane Rhythmik mit einem Minimum am Nachmittag/Abend und einem Maximum in der Nacht/am Morgen (Tab. 29, Abb. 30). Bei den jüngeren Probandinnen liegt das Minimum zwischen 16 und 20 Uhr und das Maximum um 04 Uhr. In der älteren Gruppe liegt das Minimum um 20 Uhr abends und das Maximum um 08 Uhr morgens. Im Verlauf des Versuchstages sinkt die Proteinkonzentration bei beiden Altersgruppen zum Nachmittag ab und steigt zur Nacht hin an. Es ist zu beobachten, dass die SOD1-Protein-Konzentrationen der älteren Probandinnen morgens, vormittags und nachmittags über den Konzentrationswerten der jüngeren Probandinnen liegen, sich zum Abend hin angleichen und nachts die Konzentrationen der jüngeren unterschreiten (Tab. 29, Abb. 30). Die Unterschiede zwischen den Altersgruppen sind zu keinem Zeitpunkt statistisch

signifikant (Tab. 29). Zu beobachten sind hohe interindividuelle Unterschiede, die in großen Standardabweichungen zum Ausdruck kommen.

TAB. 29: SOD1/ β -AKTIN-RATIO (PROTEIN) BEI JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN SOWIE DEREN MITTELWERTVERGLEICHE

Uhrzeit	Jüngere Frauen (N=21)		Ältere Frauen (N=21)		Mittelwertvergleiche	
	M	SD	M	SD	u	p
08:00	0,45	0,24	0,75	0,76	-0,365	0,715
12:00	0,28	0,18	0,32	0,26	-0,013	0,990
16:00	0,28	0,18	0,29	0,22	-0,088	0,930
20:00	0,28	0,25	0,28	0,22	-0,063	0,950
24:00	0,41	0,41	0,35	0,30	-0,566	0,571
04:00	0,59	0,43	0,52	0,44	-0,767	0,443

N = Probandinnenanzahl, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, u = Prüfgröße des Mann-Whitney-U-Tests, p = Irrtumswahrscheinlichkeit

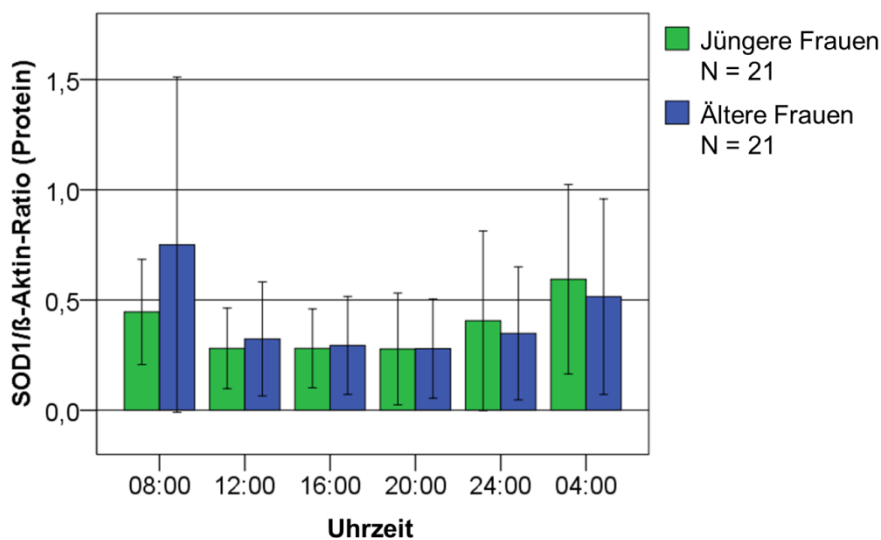


ABB. 30: SOD1/ β -AKTIN-RATIO (PROTEIN) BEI JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

Die Unterschiede der SOD1-Konzentrationen im Tagesverlauf sind sowohl in der Gesamtgruppe ($p < 0,001$) als auch bei den jüngeren ($p < 0,001$) und bei den älteren Frauen ($p = 0,001$) statistisch hoch bzw. sehr signifikant (Friedmantest). Tabelle 30 zeigt, zwischen welchen Uhrzeiten signifikante Unterschiede bestehen.

TAB. 30: VERGLEICH DER SOD1-PROTEINKONZENTRATION BEI JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN MITTELS WILCOXON-TEST

Jüngere Frauen (N=21)										
Uhrzeit	08:00		12:00		16:00		20:00		24:00	
	Z	p	Z	p	Z	p	Z	p	Z	p
12:00	-2,659	0,008	-	-	-	-	-	-	-	-
16:00	-2,485	0,013	-1,752	0,080	-	-	-	-	-	-
20:00	-2,902	0,004	-1,838	0,066	-0,295	0,768	-	-	-	-
24:00	-1,269	0,205	-2,240	0,025	-1,477	0,140	-2,346	0,019	-	-
04:00	-1,303	0,192	-1,886	0,059	-3,736	<0,001	-3,736	<0,001	-1,686	0,092
Ältere Frauen (N=21)										
Uhrzeit	08:00		12:00		16:00		20:00		24:00	
	Z	p	Z	p	Z	p	Z	p	Z	p
12:00	-3,736	<0,001	-	-	-	-	-	-	-	-
16:00	-3,041	0,002	-2,312	0,021	-	-	-	-	-	-
20:00	-3,319	0,001	-1,540	0,123	-0,122	0,903	-	-	-	-
24:00	-2,763	0,006	-2,845	0,004	-0,574	0,566	-0,713	0,467	-	-
04:00	-1,686	0,092	-2,756	0,006	-2,068	0,039	-2,416	0,016	-2,068	0,039

N = Probandinnenanzahl, Z = Prüfgröße des Wilcoxon-Tests, p = Irrtumswahrscheinlichkeit (signifikante Werte sind hervorgehoben)

7.3.3 OXIDATIVER STRESS UND MELATONIN

OXIDATIVER STRESS

Die Konzentration an OS verändert sich im Laufe des Tages (Tab. 31, Abb. 31). Hierbei nimmt der OS im Tagesverlauf von 08 Uhr morgens bis 20 Uhr abends bei jüngeren und älteren Probandinnen kontinuierlich ab. Bei den älteren Probandinnen liegt der OS um 08 Uhr morgens im Mittel bei 12.188 ± 5.526 pg/mL und sinkt bis 20 Uhr im Mittel auf 7.006 ± 2.480 pg/mL. Bei den Jüngeren beträgt die mittlere OS-Konzentration um 08 Uhr 9.477 ± 9.181 pg/mL und nimmt bis um 20 Uhr auf 4.843 ± 1.593 pg/mL ab (Tab. 31, Abb. 31). Die hohen Standardabweichungen zeigen eine sehr große interindividuelle Variabilität zu den einzelnen Uhrzeiten. Ganz besonders groß ist die Variabilität zwischen den jüngeren Probandinnen um 08 Uhr morgens. Das Absinken der Werte über den Tag beschreibt die ebenfalls großen intraindividuellen Schwankungen im Tagesverlauf. Dabei liegen die Werte der älteren Probandinnen zu jedem Messzeitpunkt signifikant über den Werten der jüngeren (Tab. 31).

TAB. 31: OXIDATIVER STRESS: 8-HYDROXY-2'-DEOXYGUANOSIN (PG/ML) BEI JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN SOWIE DEREN MITTELWERTVERGLEICHE

Uhrzeit	Jüngere Frauen (N=21)		Ältere Frauen (N=21)		Mittelwertvergleiche		
	M	SD	M	SD	t	u	p
08:00	9477,0	9180,6	12188,0	5526,0	-	-2,578	0,010
12:00	6557,9	2874,4	8926,9	3411,2	2,434	-	0,020
16:00	5680,2	2876,0	8552,5	3299,7	-	-2,805	0,005
20:00	4842,7	1593,0	7006,2	2480,3	3,363	-	0,002

N = Probandinnenanzahl, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, t = Prüfgröße des t-Tests, u = Prüfgröße des Mann-Whitney-U-Tests, p = Irrtumswahrscheinlichkeit (signifikante Werte sind hervorgehoben)

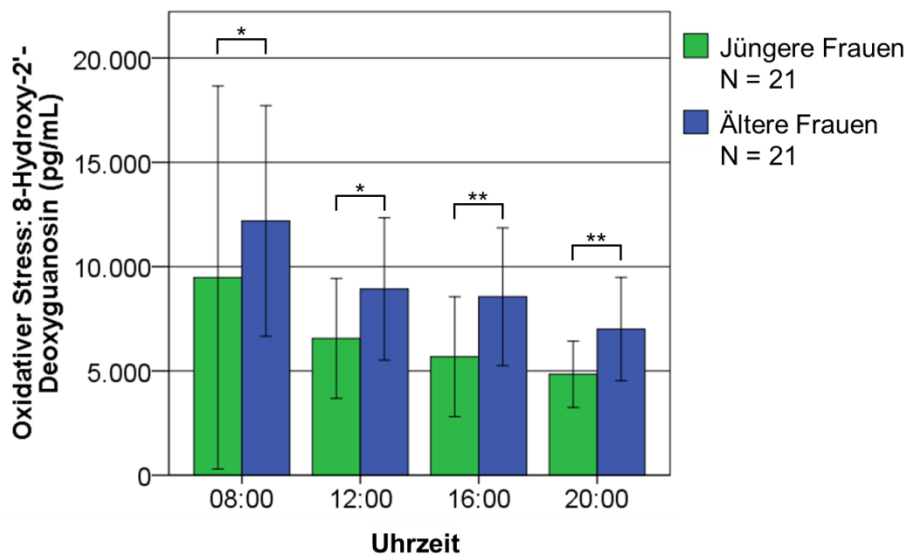


ABB. 31: OXIDATIVER STRESS: 8-HYDROXY-2'-DEOXYGUANOSIN (PG/ML) BEI JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen. * p < 0,050, ** p < 0,010

Die Abnahme der Werte im Tagesverlauf ist sowohl in der Gesamtgruppe, wie auch in den beiden Altersgruppen statistisch hoch signifikant (Friedmanteste: p < 0,001). Tabelle 32 zeigt, zu welchen Zeitpunkten signifikante Unterschiede bestehen.

TAB. 32: VERGLEICH DER OXIDATIVEN STRESS-KONZENTRATION BEI JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN MITTELS T-TEST FÜR VERBUNDENEN STICHPROBEN UND WILCOXON-TEST

Jüngere Frauen (N=21)						
Uhrzeit	08:00		12:00		16:00	
	Z	p	t/Z	p	Z	p
12:00	-3,493	<0,001	-	-	-	-
16:00	-3,597	<0,001	-2,416	0,016	-	-
20:00	-4,015	<0,001	4,245	<0,001	-1,894	0,058
Ältere Frauen (N=21)						
Uhrzeit	08:00		12:00		16:00	
	t	p	t	p	t	p
12:00	4,243	<0,001	-	-	-	-
16:00	3,574	0,002	0,693	0,496	-	-
20:00	4,903	<0,001	3,866	0,001	3,118	0,005

N = Probandinnenanzahl, t = Prüfgröße des t-Tests für verbundene Stichproben, Z = Prüfgröße des Wilcoxon-Tests (blau), p = Irrtumswahrscheinlichkeit (signifikante Werte sind hervorgehoben)

MELATONIN

Die Melatoninkonzentration folgt einer circadianen Rhythmik (Tab. 33, Abb. 32). Nach einem vormittäglichen Konzentrationsabfall liegen die Werte bis abends im Mittel bei unter 1 pg/mL. Vor 24 Uhr nachts setzt ein starker Anstieg des Nachthormons ein. Das Maximum liegt bei den Jüngeren um 04 Uhr nachts und beträgt $6,84 \pm 5,91$ pg/mL. Bei den älteren Frauen liegt der Peak um 24 Uhr nachts und beträgt im Mittel $8,78 \pm 6,19$ pg/mL. Nur um 08 Uhr morgens ist das Melatonin bei den jüngeren Probandinnen höher konzentriert als bei den älteren. Zu allen anderen Messzeitpunkten liegt die Konzentration bei den Älteren höher (Tab. 33, Abb. 32). Die Unterschiede zwischen den Altersgruppen sind ausschließlich zum Messzeitpunkt um 20 Uhr ($u = -2,507$, $p = 0,012$) statistisch signifikant (Tab. 33). Insgesamt werden in beiden Altersgruppen zu allen Messzeitpunkten hohe interindividuelle Variabilitäten verzeichnet, die durch die großen Standardabweichungen repräsentiert werden.

TAB. 33: MELATONIN-KONZENTRATION (PG/ML) BEI JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN

Uhrzeit	Jüngere Frauen (N=21)		Ältere Frauen (N=21)		Mittelwertvergleiche	
	M	SD	M	SD	u	p
08:00	3,03	3,75	2,70 ^{a)}	2,21 ^{a)}	-0,563	0,574
12:00	0,57	0,68	0,87	0,89	-1,152	0,249
16:00	0,37	0,64	0,64	0,59	-1,869	0,062
20:00	0,60	0,99	1,00	0,76	-2,507	0,012
24:00	5,91	5,57	8,78	6,19	-1,698	0,090
04:00	6,84	5,91	8,47	4,33	-1,497	0,134

N = Probandinnenanzahl, M = Mittelwert, SD = Standardabweichung, ^{a)} N = 20, u = Prüfgröße des Mann-Whitney-U-Tests, p = Irrtumswahrscheinlichkeit (signifikante Werte sind hervorgehoben)

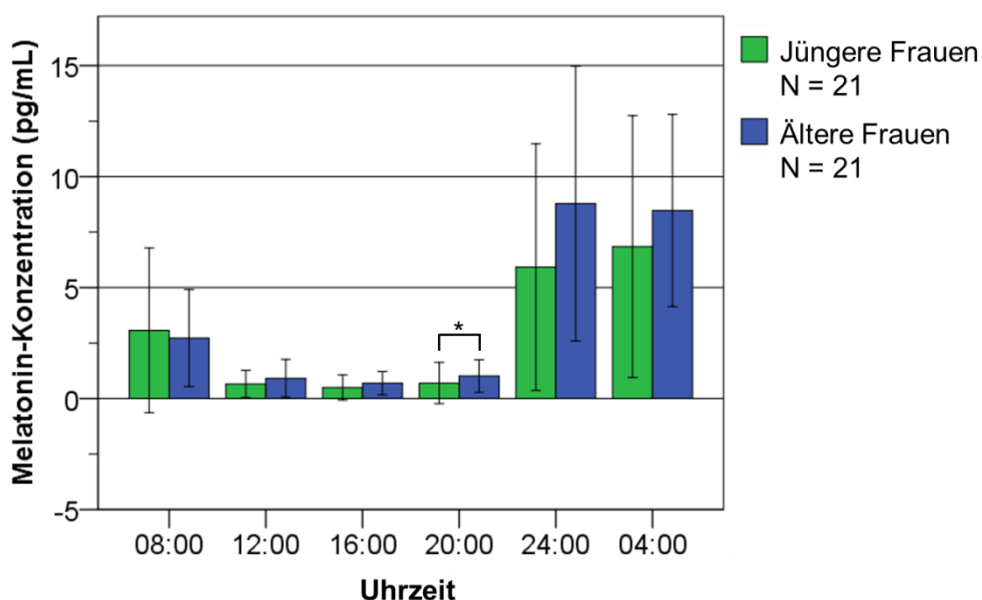


ABB. 32: MELATONIN-KONZENTRATION (PG/ML) BEI JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichung. * p < 0,050

Die Melatoninkonzentrationen unterscheiden sich im Tagesverlauf über die verschiedenen Messzeitpunkte innerhalb beider Altersgruppen signifikant voneinander (Friedman-Test: p < 0,001). Hoch signifikante Unterschiede (p-Werte < 0,001) finden sich bei den Jüngeren sowie den Älteren zwischen zahlreichen Zeitpunkten über den Tag (Tab. 34).

TAB. 34: VERGLEICH DER MELATONIN-KONZENTRATION BEI JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN MITTELS WILCOXON-TEST

Jüngere Frauen (N = 21)										
Uhrzeit	08:00		12:00		16:00		20:00		24:00	
	Z	p	Z	p	Z	p	Z	p	Z	P
12:00	-3,432	0,001	-	-	-	-	-	-	-	-
16:00	-3,516	<0,001	-1,569	0,117	-	-	-	-	-	-
20:00	-2,911	0,004	-0,094	0,925	-1,334	0,182	-	-	-	-
24:00	-2,352	0,019	-3,920	<0,001	-3,920	<0,001	-3,920	<0,001	-	-
04:00	-2,277	0,023	-3,980	<0,001	-3,920	<0,001	-3,920	<0,001	-1,512	0,131
Ältere Frauen (N = 21)										
Uhrzeit	08:00 ^{a)}		12:00		16:00		20:00		24:00	
	Z	p	Z	p	Z	p	Z	p	Z	P
12:00	-3,621	<0,001	-	-	-	-	-	-	-	-
16:00	-3,461	0,001	-1,590	0,112	-	-	-	-	-	-
20:00	-3,220	0,001	-0,989	0,322	-1,717	0,086	-	-	-	-
24:00	-3,920	<0,001	-4,015	<0,001	-4,015	<0,001	-4,015	<0,001	-	-
04:00	-3,290	<0,001	-4,015	<0,001	-4,015	<0,001	-4,015	<0,001	-0,191	0,848

N = Probandinnenanzahl, ^{a)} N = 20, Z = Prüfgröße des Wilcoxon-Tests, p = Irrtumswahrscheinlichkeit (signifikante Werte sind hervorgehoben)

7.4 ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN MERKMALEN

7.4.1 ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN GEN- UND PROTEINEXPRESSION

hBMAL1 – hSOD1

Das Uhrengenprotein BMAL1 bindet als TF an E-Box-Elemente und ermöglicht dadurch die Transkription Uhrengen-kontrollierter Gene. Das *hSod1*-Gen enthält eine solche E-Box im regulatorischen Promotorelement. Deshalb sollte geprüft werden, ob es einen Zusammenhang zwischen den Transkriptkonzentrationen der Gene *hBmal1* und *hSod1* gibt. Da untersucht werden sollte, ob beim Menschen überhaupt ein Zusammenhang zwischen den beiden genannten Genen besteht und die Gesamtgruppe die doppelte Anzahl an Probandinnen enthält, wurden die Korrelationsanalysen zuerst mit der Gesamtgruppe durchgeführt und erst im Anschluss mit den beiden einzelnen Altersgruppen. Die Korrelationsanalysen nach Pearson und Spearman (in Abhängigkeit von einer Normalverteilung der Daten) ergeben, dass positive Zusammenhänge zwischen den mRNA-Konzentrationen des Uhrengens *hBmal1* und des Gens für die SOD1 bestehen, wenn alle älteren und jüngeren Probandinnen, von denen Daten vorliegen, eingeschlossen werden

(Anhang A16.1). Zu vier der sechs Messzeitpunkte (08, 12, 20 und 24 Uhr) findet sich eine starke Effektstärke (nach Cohen 1992) des Korrelationskoeffizienten und zu zwei Zeitpunkten eine mittlere Effektstärke (16 und 04 Uhr) (Tab. 35). Die Zusammenhänge sind dabei zu fünf Messzeitpunkten statistisch signifikant, wovon drei hoch- und sehr signifikant sind (08, 12 und 24 Uhr). Abbildung 33 zeigt die Zusammenhänge zwischen den beiden Genen in der Gesamtgruppe.

TAB. 35: KORRELATIONEN IN DER GESAMTGRUPPE ZWISCHEN *hBMAL1*-GEN UND *hSOD1*-GEN (SPEARMAN-RHO UND PEARSON)

	08:00 Uhr	12:00 Uhr	16:00 Uhr	20:00 Uhr	24:00 Uhr	04:00 Uhr
rs/r	0,701	0,629	0,388	0,536	0,619	0,465
p	<0,001	0,002	0,091	0,027	0,005	0,011
N	25	21	20	17	19	29

rs = Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho (schwarz), r = Korrelationskoeffizient nach Pearson (blau), p = Irrtumswahrscheinlichkeit (signifikante Werte sind hervorgehoben), N = Probandinnenanzahl

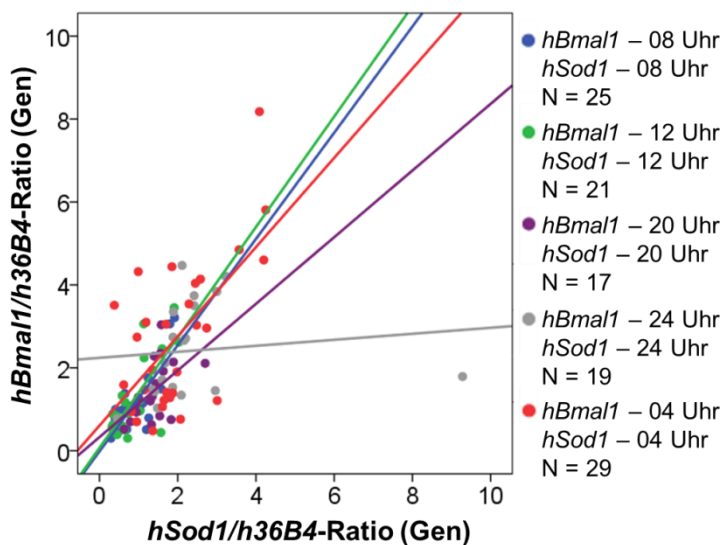


ABB. 33: KORRELATIONEN IN DER GESAMTGRUPPE ZWISCHEN *hBMAL1*-GEN UND *hSOD1*-GEN. Die graue Regressionsgerade ist durch einen einzelnen hohen *hSod1*-Ratio-Wert stark abgeflacht, während alle anderen Werte einen starken Zusammenhang anzeigen.

Bei der getrennten Betrachtung beider Altersgruppen, bestehen bei den älteren Frauen zwischen *hBmal1*- und *hSod1*-mRNA positive Korrelationen zu allen Messzeitpunkten. Die Effektstärke des Korrelationskoeffizienten ist dabei zu vier Zeitpunkten stark (08, 12, 20 und

04 Uhr) (Tab. 36). Die Zusammenhänge zwischen den beiden Genen sind zu zwei Zeitpunkten signifikant (08 und 04 Uhr, Abb. 34A), wobei die Korrelation um 08 Uhr morgens hoch signifikant ist (Tab. 36, A16.2).

Auch die jüngeren Frauen zeigen zu allen Zeitpunkten positive Korrelationen zwischen der Menge an mRNA für das *hBmal1*- und das *hSod1*-Gen. Von diesen Korrelationen zeigen vier eine starke Effektstärke (08, 12, 20 und 24 Uhr) (Tab. 36, A16.2). Die Zusammenhänge sind zu zwei Zeitpunkten (12 und 24 Uhr) signifikant (Tab. 36 und Abb. 34B).

TAB. 36: KORRELATIONEN NACH ALTERSGRUPPEN ZWISCHEN *hBMAL1*-GEN UND *hSOD1*-GEN (SPEARMAN-RHO UND PEARSON)

		08:00 Uhr	12:00 Uhr	16:00 Uhr	20:00 Uhr	24:00 Uhr	04:00 Uhr
Ältere Frauen	rs/r	0,837	0,579	0,124	0,564	0,371	0,609
	p	<0,001	0,062	0,687	0,090	0,236	0,012
	N	14	11	13	10	12	16
Jüngere Frauen	rs/r	0,579	0,809	0,286	0,710	0,773	0,324
	p	0,062	0,005	0,535	0,074	0,041	0,280
	N	11	10	7	7	7	13

rs = Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho (schwarz), r = Korrelationskoeffizient nach Pearson (blau), p = Irrtumswahrscheinlichkeit (signifikante Werte sind hervorgehoben), N = Probandinnenanzahl

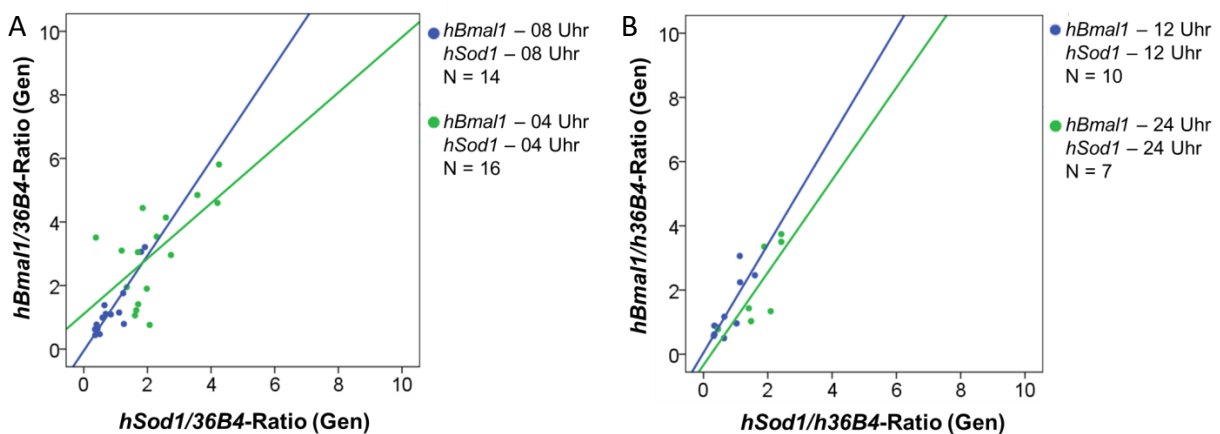


ABB. 34: KORRELATIONEN ÄLTERER (A) UND JÜNGERER (B) FRAUEN ZWISCHEN *hBMAL1*-GEN UND *hSOD1*-GEN

hSOD1 – SOD1

Um zu untersuchen, ob es beim Menschen generell Zusammenhänge zwischen der *hSod1*-mRNA- und der SOD1-Proteinkonzentration gibt, wurde zuerst die Gesamtgruppe auf Unterschiede getestet. In der Gesamtgruppe gibt es zu den einzelnen Uhrzeiten negative (08, 12, 16 und 20 Uhr) und positive (24 und 04 Uhr) Zusammenhänge. Die Effektstärke ist dabei zu vier Zeitpunkten schwach (08, 16, 24 und 04 Uhr) (Tab. 37). Zu keinem Messzeitpunkt besteht in der Gesamtgruppe ein signifikanter Zusammenhang zwischen der *hSod1*-mRNA und dem SOD1-Protein (Tab. 37, A16.3). Zwischen der Genexpression um 24 Uhr und der Proteinkonzentration um 04 Uhr nachts besteht ein negativer Zusammenhang. Der Korrelationskoeffizient zeigt eine starke Effektstärke (N = 23, $r_s = -0,532$). Diese Korrelation ist sehr signifikant (N = 23, $p = 0,009$) und ist der einzige signifikante Zusammenhang zwischen Gen und Protein (Anhang A16.3).

TAB. 37: KORRELATIONEN IN DER GESAMTGRUPPE ZWISCHEN *hSOD1*-GEN UND *SOD1*-PROTEIN (SPEARMAN-RHO)

	08:00 Uhr	12:00 Uhr	16:00 Uhr	20:00 Uhr	24:00 Uhr	04:00 Uhr
rs	-0,109	-0,094	-0,248	-0,077	0,132	0,196
p	0,565	0,655	0,266	0,739	0,548	0,299
N	30	25	22	21	23	30

rs = Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho, p = Irrtumswahrscheinlichkeit,
N = Probandinnenanzahl

Die jüngeren Probandinnen zeigen sowohl positive als auch negative Korrelationen zwischen Gen- und Proteinkonzentration. Die Effektstärken sind dabei überwiegend schwach und mittel ausgeprägt (Anhang A16.4). Eine starke Effektstärke findet sich um 24 Uhr (N = 9, $r_s = 0,703$). Der Zusammenhang zwischen *hSod1*-Gen und SOD1-Protein ist zu diesem Zeitpunkt signifikant (N = 9, $p = 0,035$). Weitere signifikante Zusammenhänge gibt es zwischen diesen Variablen bei den jungen Frauen nicht. Auch bei den älteren Frauen zeigen positive wie negative Zusammenhänge mit meist schwacher bis mittlerer Effektstärke. Starke Effekte finden sich zwischen der Genexpression um 24 Uhr und der Proteinexpression um 12 Uhr mittags (N = 14, $r_s = -0,657$, $p = 0,011$) sowie zwischen der Genexpression um 24 Uhr und der Proteinexpression um 04 Uhr nachts (N = 14, $r_s = -0,723$, $p = 0,003$). Diese beiden Zusammenhänge sind die einzigen beiden signifikanten bei den älteren Frauen (Anhang A16.4).

Um zu untersuchen, ob eine hohe Proteinkonzentration zu einem Zeitpunkt mit ebenfalls hohen SOD1-Proteinkonzentrationen zu anderen Zeitpunkten zusammenhängt, wurden die SOD1-Konzentrationen sowohl in der Gesamtgruppe als auch in den beiden einzelnen Altersgruppen auf Zusammenhänge geprüft. Die Korrelationen zwischen den einzelnen Messzeiten sind alle positiv. Die Effektstärke von r / r_s ist durchgängig mittel oder stark. Dabei finden sich signifikante bis hoch signifikante Zusammenhänge zwischen den Proteinkonzentrationen untereinander zu den verschiedenen Zeitpunkten. Dies gilt sowohl für die Gesamtgruppe als auch für die jüngeren und älteren Probandinnen unabhängig voneinander (Anhang A16.5 und A16.6).

7.4.2 ZUSAMMENHÄNGE VON OXIDATIVEM STRESS UND MELATONIN MIT *hBMAL1*, *hSOD1* UND SOD1

Um zu untersuchen, welche Art von Beziehungen zwischen OS und Melatonin untereinander sowie mit anderen Variablen, deren circadiane Rhythmik gezeigt wurde, bestehen, wurden diverse Korrelationsanalysen durchgeführt. Deren Ergebnisse werden im Folgenden vorgestellt.

OXIDATIVER STRESS

Die oxidativen Stresswerte zeigen untereinander positive Zusammenhänge mit durchgängig starken Effektstärken ($N = 42$, $r_s = 0,692$ bis $r_s = 0,924$) (Anhang A16.7). In der Gesamtgruppe sind alle OS-Werte untereinander hoch signifikant korreliert ($N = 42$, $p < 0,001$). Das bedeutet, Probandinnen mit einem hohen OS-Wert zu einem Zeitpunkt haben in der Regel auch zu den anderen Zeitpunkten sehr hohe OS-Werte. Dies lässt sich ebenso für jüngere und ältere Frauen beobachten: durchgängig positive Zusammenhänge der OS-Werte untereinander bei starken Effektstärken (Anhang A16.8). Die Zusammenhänge sind dabei alle in beiden Altersgruppen signifikant.

OS – *hBMAL1*: Zwischen dem OS und dem *hBmal1*-Gen sind positive wie negative Zusammenhänge zu beobachten. Diese weisen eine meist schwache Effektstärke auf. Die einzige mittlere Effektstärke besteht in der Gesamtgruppe zwischen der morgendlich hohen *hBmal1*-Konzentration und einer hohen OS-Konzentration um 16 Uhr ($N = 27$, $r = 0,388$). Dieser Zusammenhang ist statistisch signifikant ($p = 0,046$). Zu keinem anderen Zeitpunkt in der Gesamtgruppe sowie zu keinem Zeitpunkt bei den jüngeren und älteren Frauen bestehen signifikante Korrelationen (Anhang A16.9 und A16.10).

OS – hSOD1/SOD1: Da das *hSod1*-Gen bzw. das SOD1-Protein den OS direkt beeinflusst, indem es selbigem entgegenwirkt, wurden diese Variablen auf Korrelationen geprüft (Anhang A16.11-16.14). Zwischen dem OS und dem *hSod1*-Gen bzw. dem SOD1-Protein bestehen positive wie negative Zusammenhänge, die jedoch wenn überhaupt nur eine schwache Effektstärke zeigen. Zu keinem Zeitpunkt bestehen signifikante Zusammenhänge. Dies gilt sowohl für die Gesamtgruppe als auch für die jüngere und ältere Gruppe.

OS – MELATONIN: Der OS wurde auf Zusammenhänge mit Melatonin untersucht (A16.15 und A16.16), das dem OS über zwei Mechanismen entgegenwirkt, indem es einerseits selbst als Antioxidans wirkt und andererseits die Menge an SOD1-Protein steigern kann. In der Gesamtgruppe bestehen zwischen dem OS und Melatonin positive wie negative Zusammenhänge. Diese zeigen eine mittlere Effektstärke zwischen der mittleren Melatoninkonzentration um 16 Uhr und den OS-Werten um 08 Uhr ($N = 42$, $r_s = 0,329$, $p = 0,034$) und 20 Uhr ($N = 42$, $r_s = 0,355$, $p = 0,021$). Die Korrelationen sind dabei zu beiden Zeitpunkten signifikant.

Die jüngeren Frauen zeigen positive und negative Zusammenhänge, von denen einige eine mittlere Effektstärke aufweisen (A16.16). Signifikant positive Korrelationen finden sich zwischen der Melatoninkonzentration um 08 Uhr morgens und den mittleren OS-Werten um 08 Uhr ($N = 21$, $r_s = 0,495$, $p = 0,022$) und 12 Uhr ($N = 21$, $r_s = 0,437$, $p = 0,048$).

Bei den älteren Frauen überwiegen die negativen Zusammenhänge, jedoch finden sich auch positive (A16.16). Die Effektstärke ist größtenteils gering und nur zu wenigen Zeitpunkten zeigt sich eine mittlere Effektstärke. Solche mittleren Effektstärken finden sich zwischen dem mittleren OS-Wert um 16 Uhr und der Melatoninkonzentration um 12 Uhr ($N = 21$, $r_s = -0,331$, $p = 0,143$) sowie zwischen dem mittleren OS-Wert um 20 Uhr und der Melatoninkonzentration um 08 Uhr ($N = 20$, $r_s = -0,325$, $p = 0,162$). Weitere mittlere Effektstärken in Kombination mit signifikanten Zusammenhänge finden sich bei den älteren Frauen zwischen dem mittleren OS-Wert um 12 Uhr und der Melatoninkonzentration um 24 Uhr ($N = 21$, $r_s = -0,479$, $p = 0,028$) sowie zwischen der OS-Konzentration um 16 Uhr und den Melatoninkonzentrationen um 24 Uhr ($N = 21$, $r_s = -0,470$, $p = 0,032$) und um 04 Uhr ($N = 21$, $r_s = -0,477$, $p = 0,029$).

MELATONIN

MELATONIN-HBMAL1: BMAL1 könnte als wichtiger Regulator der negativen Rückkopplungsschleife für den Schlaf-Wach-Rhythmus das Nachthormon Melatonin beeinflussen. Zugleich kommt Melatonin auch als Regulator von Uhrengenen in Betracht. Deshalb wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der *hBmal1*-mRNA-Konzentration und der Melatoninkonzentration zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten besteht. In der Gesamtgruppe sind die meisten Zusammenhänge zwischen *hBmal1*-mRNA und Melatoninkonzentration positiv. Die Effektstärken sind teils stark (Tab. 38) und zu etlichen Zeitpunkten können signifikante Korrelationen beobachtet werden. In der Gesamtgruppe (N = 31) bestehen solch (sehr) signifikant positive Zusammenhänge zwischen der *hBmal1*-Genexpression um 04 Uhr und der Melatoninkonzentration um 08 Uhr ($r_s = 0,508$, $p = 0,003$), 12 Uhr ($r_s = 0,541$, $p = 0,002$), 20 Uhr ($r_s = 0,356$, $p = 0,049$), 24 Uhr ($r_s = 0,409$, $p = 0,022$) (Abb. 35) sowie der mittleren Melatoninkonzentration über den Tag ($r_s = 0,410$, $p = 0,022$). Dies bedeutet, je höher die *hBmal1*-Genexpression um 04 Uhr morgens, die zu diesem Zeitpunkt im Mittel ihr Maximum erreicht, umso höher ist auch die Melatoninkonzentration zu den beschriebenen Zeitpunkten. Weitere signifikant positive Korrelationen finden sich zwischen der *hBmal1*-Expression um 12 Uhr (N = 23) und den Melatoninkonzentrationen um 08 Uhr ($r_s = 0,454$, $p = 0,030$), 12 Uhr ($r_s = 0,500$, $p = 0,015$) und 24 Uhr ($r_s = 0,437$, $p = 0,037$). Hinzu kommen signifikant positive Korrelationen zwischen der *hBmal1*-Expression um 16 Uhr und der Melatoninkonzentration um 20 Uhr (N = 20, $r_s = 0,547$, $p = 0,013$) sowie zwischen der *hBmal1*-Expression um 20 Uhr und der Melatoninkonzentration um 16 Uhr (N = 18, $r_s = 0,509$, $p = 0,031$).

TAB. 38: KORRELATIONEN IN DER GESAMTGRUPPE ZWISCHEN MELATONINKONZENTRATION UND *hBMAL1*-GEN (SPEARMAN-RHO)

			<i>hBmal1/h36B4</i> -Ratio (Gen)						
			08:00 Uhr	12:00 Uhr	16:00 Uhr	20:00 Uhr	24:00 Uhr	04:00 Uhr	Mittel- wert ^b
Melatonin- Konzentration (pg/ml)	08:00 Uhr	rs	0,002	0,454	0,080	0,264	-0,094	0,508	-0,195
		p	0,993	0,030	0,737	0,290	0,677	0,003	0,255
		N	27	23	20	18	22	31	36
	12:00 Uhr	rs	0,085	0,500	0,411	0,057	0,294	0,541	-0,082
		p	0,673	0,015	0,071	0,822	0,183	0,002	0,630
		N	27	23	20	18	22	31	37
	16:00 Uhr	rs	0,099	0,215	0,421	0,509	0,143	0,332	-0,097
		p	0,625	0,324	0,065	0,031	0,525	0,068	0,567
N		27	23	20	18	22	31	37	
20:00 Uhr	rs	0,238	0,181	0,547	0,379	0,227	0,356	-0,172	
	p	0,232	0,408	0,013	0,121	0,311	0,049	0,310	
	N	27	23	20	18	22	31	37	
24:00 Uhr	rs	0,133	0,437	0,253	0,251	0,074	0,409	-0,164	
	p	0,508	0,037	0,283	0,316	0,744	0,022	0,332	
	N	27	23	20	18	22	31	37	
04:00 Uhr	rs	0,535	0,095	0,048	-0,261	0,146	0,198	-0,244	
	p	0,004	0,667	0,840	0,295	0,516	0,286	0,146	
	N	27	23	20	18	22	31	37	
Melatonin- Mittelwert ^a	rs	0,274	0,271	0,156	0,123	0,067	0,410	-0,272	
	p	0,166	0,211	0,510	0,627	0,766	0,022	0,108	
	N	27	23	20	18	22	31	36	

rs = Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho (schwarz), p = Irrtumswahrscheinlichkeit (signifikante Werte sind hervorgehoben), N = Probandinnenanzahl, ^a = Mittelwert der Melatoninkonzentrationen (von 6 Messzeitpunkten), ^b = Mittelwert der *hBmal1*-Ratios (von 6 Messzeitpunkten)

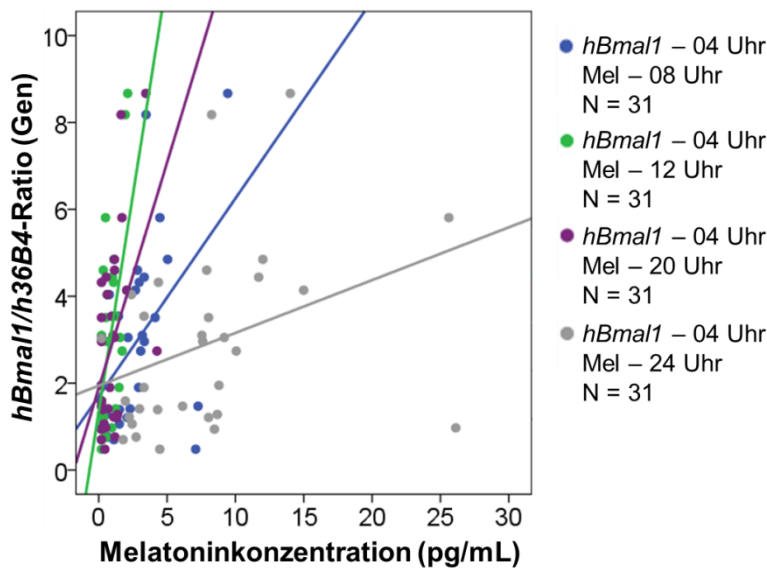


ABB. 35: KORRELATIONEN IN DER GESAMTGRUPPE ZWISCHEN *hBMAL1*-GEN UND DER MELATONINKONZENTRATION, Mel = Melatoninkonzentration (pg/mL)

Werden nur die einzelnen Altersgruppen betrachtet, finden sich bei den älteren Probandinnen überwiegend positive Zusammenhänge, die teils große Effektstärken aufweisen (Tab. 39). Sehr und hoch signifikante Zusammenhänge gibt es zwischen der *hBmal1*-Expression um 04 Uhr und der Melatoninkonzentration um 08 Uhr ($r_s = 0,727$, $p = 0,001$, $N = 17$), 24 Uhr ($r_s = 0,846$, $p < 0,001$, $N = 17$) und der mittleren Konzentration über den Tag ($r = 0,777$, $p < 0,001$, $N = 17$). Zudem finden sich bei den älteren Frauen signifikante Zusammenhänge zwischen der *hBmal1*-Expression um 20 Uhr und der Melatoninkonzentration um 16 Uhr ($N = 11$, $r_s = 0,730$, $p = 0,011$) sowie zwischen der *hBmal1*-Expression um 12 Uhr und der Melatoninkonzentration um 24 Uhr ($N = 13$, $r_s = 0,643$, $p = 0,018$) (Abb. 36A).

Auch bei der jüngeren Gruppe bestehen überwiegend positive Zusammenhänge (Tab. 40), insbesondere mit mittleren und starken Effekten, von denen es jedoch weniger gibt als bei den älteren Frauen. Bei den Jüngeren bestehen nur drei signifikante Korrelationen: eine zwischen der *hBmal1*-Expression um 08 Uhr und der Melatoninkonzentration um 04 Uhr ($N = 12$, $r_s = 0,641$, $p = 0,025$), eine zweite zwischen der *hBmal1*-Expression um 12 Uhr und der Melatoninkonzentration um 12 Uhr ($N = 10$, $r_s = 0,635$, $p = 0,049$) und eine dritte zwischen der *hBmal1*-Expression um 04 Uhr und der Melatoninkonzentration um 12 Uhr ($N = 14$, $r_s = 0,570$, $p = 0,033$) (Abb. 36B).

TAB. 39: KORRELATIONEN BEI ÄLTEREN FRAUEN ZWISCHEN MELATONINKONZENTRATION UND *hBMAL1*-GEN (SPEARMAN-RHO UND PEARSON)

			<i>hBmal1/h36B4</i> -Ratio (Gen)						
			08:00 Uhr	12:00 Uhr	16:00 Uhr	20:00 Uhr	24:00 Uhr	04:00 Uhr	Mittel- wert ^b
Melatonin- Konzentration (pg/ml)	08:00 Uhr	rs	0,241	0,536	0,122	0,211	-0,290	0,727	-0,059
		p	0,386	0,059	0,692	0,533	0,314	0,001	0,811
		N	15	13	13	11	14	17	19
	12:00 Uhr	rs	-0,180	0,448	0,382	0,051	0,140	0,322	0,256
		p	0,520	0,125	0,198	0,881	0,633	0,208	0,276
		N	15	13	13	11	14	17	20
	16:00 Uhr	rs	0,084	0,426	0,390	0,730	0,124	0,305	0,384
		p	0,767	0,146	0,188	0,011	0,674	0,234	0,094
		N	15	13	13	11	14	17	20
	20:00 Uhr	rs	0,107	0,495	0,330	0,182	0,224	0,451	0,363
		p	0,704	0,086	0,271	0,593	0,441	0,069	0,115
		N	15	13	13	11	14	17	20
	24:00 Uhr	rs	-0,039	0,643	0,170	0,555	-0,073	0,846	0,035
		p	0,889	0,018	0,578	0,077	0,805	<0,001	0,885
N		15	13	13	11	14	17	20	
04:00 Uhr	rs/r	0,361	0,308	0,042	-0,044	-0,024	0,314	-0,080	
	p	0,187	0,306	0,893	0,898	0,936	0,220	0,738	
	N	15	13	13	11	14	17	20	
Mela- tonin- Mittel- wert ^a	rs/r	0,182	0,505	0,133	0,451	-0,139	0,777	-0,034	
	p	0,516	0,078	0,666	0,164	0,635	<0,001	0,889	
	N	15	13	13	11	14	17	19	

rs = Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho (schwarz), r = Korrelationskoeffizient nach Pearson (blau), p = Irrtumswahrscheinlichkeit (signifikante Werte sind hervorgehoben), N = Probandinnenanzahl, ^a = Mittelwert der Melatoninkonzentrationen (von 6 Messzeitpunkten), ^b = Mittelwert der *hBmal1*-Ratios (von 6 Messzeitpunkten)

TAB. 40: KORRELATIONEN BEI JÜNGEREN FRAUEN ZWISCHEN MELATONINKONZENTRATION UND *hBmal1*-GEN (SPEARMAN-RHO)

			<i>hBmal1/h36B4</i> -Ratio (Gen)						
			08:00 Uhr	12:00 Uhr	16:00 Uhr	20:00 Uhr	24:00 Uhr	04:00 Uhr	Mittel- wert ^b
Melatonin- Konzentration (pg/ml)	08:00 Uhr	rs	-0,332	0,244	-0,408	0,148	-0,012	0,133	-0,318
		p	0,292	0,497	0,364	0,751	0,978	0,650	0,213
		N	12	10	7	7	8	14	17
	12:00 Uhr	rs	0,240	0,635	0,223	-0,256	0,520	0,570	-0,297
		p	0,453	0,049	0,631	0,579	0,186	0,033	0,247
		N	12	10	7	7	8	14	17
	16:00 Uhr	rs	-0,291	-0,009	-0,134	-0,408	0,152	0,066	-0,252
		p	0,359	0,981	0,775	0,363	0,719	0,822	0,328
		N	12	10	7	7	8	14	17
	20:00 Uhr	rs	0,281	-0,116	0,408	0,222	0,293	0,162	-0,368
		p	0,376	0,749	0,364	0,632	0,482	0,579	0,146
		N	12	10	7	7	8	14	17
24:00 Uhr	rs	-0,060	0,224	0,143	-0,393	0,095	-0,165	-0,140	
	p	0,854	0,533	0,760	0,383	0,823	0,573	0,593	
	N	12	10	7	7	8	14	17	
04:00 Uhr	rs	0,641	-0,333	-0,143	-0,750	0,214	-0,055	-0,245	
	p	0,025	0,347	0,760	0,052	0,610	0,852	0,343	
	N	12	10	7	7	8	14	17	
Mela- tonin- Mittel- wert ^a	rs	0,049	-0,030	0,036	-0,536	0,190	-0,143	-0,201	
	p	0,880	0,934	0,939	0,215	0,651	0,626	0,439	
	N	12	10	7	7	8	14	17	

rs = Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho (schwarz), p = Irrtumswahrscheinlichkeit (signifikante Werte sind hervorgehoben), N = Probandinnenanzahl, ^a = Mittelwert der Melatoninkonzentrationen (von 6 Messzeitpunkten), ^b = Mittelwert der *hBmal1*-Ratios (von 6 Messzeitpunkten)

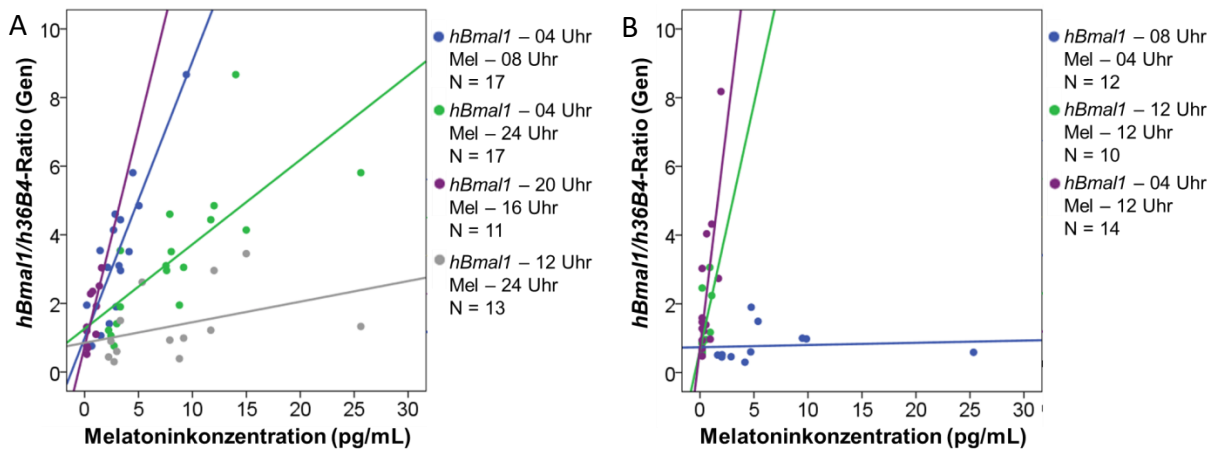


ABB. 36: KORRELATIONEN ÄLTERER (A) UND JÜNGERER (B) FRAUEN ZWISCHEN *hBMAL1*-GEN UND DER MELATONINKONZENTRATION. Bei den jüngeren Frauen ist die Regressionsgerade durch einen einzelnen hohen Melatonin-Wert stark abgeflacht, während alle anderen Werte einen starken Zusammenhang anzeigen. Mel = Melatoninkonzentration (pg/mL)

MELATONIN – *hSOD1*/SOD1: Melatonin, das die Menge an SOD1-Protein erhöhen kann, wurde auf Korrelationen mit dem *hSod1*-Gen sowie dem SOD1-Protein untersucht. Die Gesamtgruppe zeigt positive und negative Zusammenhänge zwischen dem *hSod1*-Gen und Melatonin, deren Effektstärken überwiegend schwach sind. Einige Zusammenhänge zeigen hingegen mittlere und ein Zusammenhang starke Effekte und sind signifikant. Signifikante Korrelationen finden sich zwischen der Melatoninkonzentration um 12 Uhr und der *hSod1*-mRNA-Menge um 04 Uhr (N = 30, $r_s = 0,389$, $p = 0,034$) sowie eine sehr signifikante Korrelation zwischen der Melatoninkonzentration um 20 Uhr und der *hSod1*-mRNA-Konzentration um 04 Uhr (N = 30, $r_s = 0,557$, $p = 0,001$) (Anhang A16.17).

Sowohl bei den jüngeren Probandinnen als auch bei den älteren Probandinnen zeigen sich positive und negative Zusammenhänge mit überwiegend schwachen Effekten. Mittlere und starke Effekte finden sich bei den Älteren zwischen der Melatoninkonzentration um 04 Uhr mit den *hSod1*-Ratios um 16 (N = 14, $r_s = -0,582$, $p = 0,029$), 20 (N = 11, $r_s = -0,482$, $p = 0,133$) und 24 Uhr (N = 14, $r_s = -0,310$, $p = 0,281$) sowie zwischen der Melatoninkonzentration um 20 Uhr und dem *hSod1*-Ratio um 04 Uhr (N = 17, $r_s = -0,562$, $p = 0,019$). Von diesen Zusammenhängen sind jedoch nur der erste sowie der letzte statistisch signifikant (Anhang A16.18). Bei den jüngeren Frauen finden sich wenige mittlere Effekte und ein starker, jedoch keine signifikanten Zusammenhänge.

Zwischen der Melatoninkonzentration und der SOD1-Proteinkonzentration bestehen in der Gesamtgruppe nur schwache Effekte sowie kein signifikanter Zusammenhang, obwohl sich die circadianen Rhythmen mit Peaks in der Nacht und am Morgen ähneln (Anhang A16.19). Bei den jüngeren Probandinnen besteht bei mittlerer Effektstärke ein signifikanter positiver Zusammenhang zwischen den Konzentrationen von Melatonin und der SOD1 um 16 Uhr (N = 21, $r_s = 0,483$, $p = 0,027$). Außerdem besteht bei ebenfalls mittlerer Effektstärke ein weiterer positiver Zusammenhang zwischen der Melatoninkonzentration um 24 Uhr und dem SOD1-Protein um 04 Uhr (N = 21, $r_s = 0,466$, $p = 0,033$). Der Melatoninmittelwert zeigt signifikante Korrelationen mit dem SOD1-Protein um 16 Uhr (N = 21, $r_s = 0,488$, $p = 0,025$) sowie um 04 Uhr (N = 21, $r_s = 0,499$, $p = 0,021$). Bei den Älteren bestehen fast ausschließlich schwache Effekte und es ist keinerlei signifikante Korrelation erkennbar (Anhang A16.20).

7.4.3 ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN DEN LEBENSSTIL BETREFFENDEN VARIABLEN UND *hBMAL1*-GEN, *hSOD1*-GEN UND SOD1-PROTEIN

hBMAL1-GEN – LEBENSSTIL

In beiden Altersgruppen findet sich ein negativer Zusammenhang zwischen der *hBmal1*-Konzentration um 12 Uhr und der erreichten Punktzahl im D-MEQ (Anhang A16.21). Der Effekt ist sowohl bei Älteren (N = 13, $r_s = -0,648$, $p = 0,017$) als auch bei Jüngeren (N = 10, $r_s = -0,772$, $p = 0,009$) stark und die Korrelationen sind signifikant. Bei den Älteren besteht bei starkem Effekt eine weitere signifikant negative Korrelation zwischen der *hBmal1*-Konzentration um 20 Uhr und den D-MEQ-Punkten (N = 14, $r = -0,813$, $p = 0,002$).

Die Schlafqualität (PSQI-Punkte) zeigt einen positiven Zusammenhang mit der *hBmal1*-Konzentration. Die Effektstärke ist dabei mittel bis stark und es gibt bei den jüngeren und bei den älteren Frauen signifikante Korrelationen (Anhang A16.21). Bei den Jüngeren besteht eine solche zwischen der erreichten Punktzahl im PSQI und der *hBmal1*-Konzentration um 16 Uhr (N = 7, $r_s = 0,873$, $p = 0,010$) und bei den Älteren um 20 (N = 11, $r = 0,651$, $p = 0,030$) und 04 (N = 17, $r = 0,538$, $p = 0,026$) Uhr.

Zwischen der *hBmal1*-Konzentration und dem Stress-Punktwert finden sich in beiden Altersgruppen positive und negative Zusammenhänge (Anhang A16.21). Bei den Älteren bestehen zwei mittlere Effekte (08 Uhr: N = 15, $r_s = -0,419$, $p = 0,120$ und 20 Uhr: N = 11, $r = 0,302$, $p = 0,366$). Die jüngeren Frauen zeigen zwei starke Effekte (16 Uhr: N = 7, $r_s = 0,811$,

$p = 0,027$ und 20 Uhr: $N = 7$, $r = -0,601$, $p = 0,153$). Nur die Korrelation der jüngeren Frauen um 16 Uhr ist statistisch signifikant.

Die im Freien verbrachte Zeit (Freizeit) korreliert positiv mit *hBmal1*-Konzentrationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Anhang A16.21-16.22). In der Gesamtgruppe betrifft dies die *hBmal1*-Konzentration um 16 Uhr ($N = 20$, $r_s = 0,458$, $p = 0,042$), bei den älteren Frauen die *hBmal1*-Konzentration um 24 Uhr ($N = 14$, $r = 0,590$, $p = 0,026$) und bei den jüngeren Frauen die *hBmal1*-Konzentration um 16 Uhr ($N = 7$, $r_s = 0,767$, $p = 0,044$).

Auch Bewegung zeigt in beiden Altersgruppen positive und negative Zusammenhänge mit der *hBmal1*-Konzentration (Anhang A16.21). Bei den älteren Frauen findet sich eine negative Korrelation zwischen der *hBmal1*-Konzentration um 20 Uhr und der körperlichen Aktivität. Dieser Zusammenhang zeigt einen starken Effekt und ist signifikant ($N = 11$, $r_s = -0,732$, $p = 0,010$). Die älteren Frauen zeigen zudem eine negative Korrelation zwischen der mittleren *hBmal1*-Konzentration über den Tag und der Sportstundenanzahl pro Woche. Die Effektstärke ist dabei stark und die Korrelation ist signifikant ($N = 20$, $r_s = -0,515$, $p = 0,020$). Bei den jüngeren Frauen findet sich ein negativer Zusammenhang zwischen der körperlichen Aktivität und der *hBmal1*-Ratio um 20 Uhr ($N = 7$, $r_s = -0,791$, $p = 0,034$) sowie zwei weitere negative Zusammenhänge zwischen der Sportstundenanzahl pro Woche und dem *hBmal1*-Ratio ($N = 7$, $r_s = -0,750$, $p = 0,052$ und $N = 7$, $r_s = -0,721$, $p = 0,068$). Während die Effektstärke bei allen drei Zusammenhängen stark ist, ist nur der Zusammenhang zwischen dem *hBmal1*-Ratio und der körperlichen Aktivität signifikant.

Der Kaffee- und Schwarzteeconsum zeigt in beiden Altersgruppen überwiegend positive Korrelationen mit der *hBmal1*-Konzentration (Anhang A16.21). Bei den Älteren bestehen nur schwache und mittlere Effekte und es gibt keine signifikanten Zusammenhänge. Bei den Jüngeren hingegen findet sich um 20 Uhr ein starker Effekt ($N = 7$, $r_s = 0,778$, $p = 0,039$). Dieser Zusammenhang ist signifikant.

hSOD1-GEN – LEBENSSTIL

Die Konzentration an *hSod1*-mRNA zeigt in beiden Altersgruppen positive und negative Zusammenhänge mit der Morgenpräferenz (Punkte im D-MEQ). Bei den Älteren ist der Effekt nur schwach und die Ergebnisse sind nicht signifikant (Anhang A16.23). Bei den Jüngeren hingegen zeigt sich zu zwei Zeitpunkten ein starker Effekt (08 Uhr: $N = 14$, $r_s = -0,501$,

$p = 0,068$ und 20 Uhr: $N = 9$, $r_s = 0,690$, $p = 0,040$). Der Zusammenhang um 20 Uhr ist dabei signifikant.

Die Schlafqualität (PSQI-Punkte) zeigt ebenfalls positive und negative Zusammenhänge mit der *hSod1*-Konzentration (Anhang A16.23), wobei die positiven bei den Jüngeren überwiegen. Die Effekte sind bei den Älteren nur schwach mit der Ausnahme eines starken Effekts um 20 Uhr ($N = 11$, $r = 0,705$, $p = 0,015$). Bei den jüngeren Frauen bestehen einige mittlere Effekte sowie ein starker um 16 Uhr ($N = 8$, $r = 0,730$, $p = 0,040$). Die Korrelationen mit starker Effektstärke sind in beiden Altersgruppen jeweils signifikant.

Zwischen dem Stress-Punktwert und der *hSod1*-Konzentration bestehen positive wie negative Korrelationen in beiden Altersgruppen (Anhang A16.23). Bei den Älteren gibt es ausschließlich schwache bis mittlere Effekte, die jedoch nicht signifikant sind. Die Jüngeren zeigen Korrelationen mit starken Effekten um 16 Uhr ($N = 8$, $r = 0,777$, $p = 0,023$) sowie mit der mittleren *hSod1*-Ratio über den Tag ($N = 6$, $r = 0,888$, $p = 0,018$). Beide Zusammenhänge sind signifikant, wohingegen bei den Älteren keine signifikanten Zusammenhänge bestehen.

Der körperliche Aktivitätsgrad zeigt bei den älteren Frauen durchweg negative Korrelationen mit der *hSod1*-Konzentration, während bei den Jüngeren sowohl negative als auch positive Zusammenhänge bestehen (Anhang A16.23). Die Effektstärke ist in beiden Altersgruppen überwiegend schwach. Ausnahmen bilden der starke Effekt bei den Älteren um 20 Uhr ($N = 11$, $r_s = -0,887$, $p < 0,001$) und der ebenfalls starke Effekt bei den jüngeren Frauen um 16 Uhr ($N = 8$, $r_s = 0,507$, $p = 0,200$). Nur der Zusammenhang bei den älteren Frauen ist statistisch signifikant.

Der Konsum von Kaffee und Schwarztee zeigt positive und negative Zusammenhänge mit der *hSod1*-Konzentration (Anhang A16.23). Bei den älteren Frauen bestehen nur schwache und mittlere Effekte (n.s.), wohingegen es bei den jüngeren auch starke Effekte gibt (z. B. 08 Uhr: $N = 15$, $r = 0,622$, $p = 0,013$), von denen der um 08 Uhr morgens signifikant ist.

SOD1-PROTEIN – LEBENSSTIL

Das SOD1-Protein zeigt nur wenige signifikante Zusammenhänge mit Parametern, die den Lebensstil betreffen (Anhang A16.24). In der Gruppe der älteren Frauen finden sich bei starken Effekten signifikant positive Korrelationen zwischen der Konzentration an SOD1-Protein zu verschiedenen Zeitpunkten und allen Variablen, die den Sport betreffen. Dies sind

Sportstunden pro Woche (08 Uhr: $N = 21$, $r_s = 0,540$, $p = 0,011$ und 24 Uhr: $N = 21$, $r_s = 0,632$, $p = 0,002$), Anzahl der Sporteinheiten pro Woche (16 Uhr: $N = 21$, $r_s = 0,508$, $p = 0,019$) sowie der körperliche Aktivitätsgrad (24 Uhr: $N = 21$, $r_s = 0,553$, $p = 0,009$).

Bei den jüngeren Probandinnen finden sich bei mittleren Effektstärken signifikant negative Korrelationen zwischen der SOD1-Konzentration um 20 Uhr und dem subjektiv empfundenen Stress ($N = 21$, $r_s = -0,441$, $p = 0,046$) sowie zwischen der SOD1-Konzentration um 04 Uhr und dem Konsum an Kaffee und Schwarztee ($N = 21$, $r_s = -0,439$, $p = 0,047$).

7.4.4 ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN DEN LEBENSSTIL BETREFFENDEN VARIABLEN UND MELATONIN

Als Nachthormon spielt Melatonin eine essentielle Rolle für Parameter, die mit dem Schlaf in Verbindung stehen. Deshalb wurden Zusammenhänge zwischen der Melatoninkonzentration und verschiedenen Variablen, die Schlafqualität, Morgenpräferenz und tageszeitliche Nickerchen betreffen, geprüft (A16.25-A16.28). Zwischen den Melatoninkonzentrationen der verschiedenen Zeitpunkte, der mittleren Melatoninkonzentration und der Schlafqualität (Punkte nach PSQI) bestehen in beiden Altersgruppen positive und negative Zusammenhänge. Die Effektstärken sind dabei überwiegend schwach und es bestehen keine signifikanten Korrelationen (A16.26).

Zwischen der im Freien verbrachten Zeit und der Melatoninkonzentration um 12 Uhr ($N = 21$, $r_s = 0,493$, $p = 0,023$) bzw. um 20 Uhr ($N = 21$, $r_s = 0,458$, $p = 0,037$) gibt es bei den Älteren positive Zusammenhänge mit mittleren Effektstärken. Beide Korrelationen sind signifikant.

Zwischen der Melatoninkonzentration und der erreichten Punktzahl im D-MEQ bestehen in den beiden Altersgruppen positive und negative Zusammenhänge (Anhang A16.26). Die Effektstärken sind schwach und es gibt keine signifikanten Korrelationen. Werden alle Frauen zusammen in einer Gesamtgruppe betrachtet (Anhang A16.25), besteht ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen der abendlichen Melatoninkonzentration um 20 Uhr und der erreichten Punktzahl im D-MEQ ($N = 42$, $r_s = 0,351$, $p = 0,022$) (Abb. 37). Je höher die Melatoninkonzentration um 20 Uhr ist, umso früher folgt der zweite Nachtpeak. Beide Nachtpeaks zeigen eine negative Korrelation mit der Melatoninkonzentration um 04 Uhr (1. Nachtpeak: $N = 42$, $r_s = -0,355$, $p = 0,021$ und 2. Nachtpeak: $N = 41$, $r_s = -0,315$, $p = 0,045$).

Zwischen der Nickerchendauer am Tag und der Melatoninkonzentration um 08 Uhr bestehen in der Gesamtgruppe ($N = 41$, $r_s = -0,350$, $p = 0,025$) (Abb. 37) sowie in der älteren Gruppe

(N = 20, $r_s = -0,514$, $p = 0,021$) negative Zusammenhänge (A16.27-16.28). Diese sind bei mittlerer und starker Effektstärke signifikant. Je länger die Nickerchen am Tage, umso geringer war also die Melatoninkonzentration am Morgen.

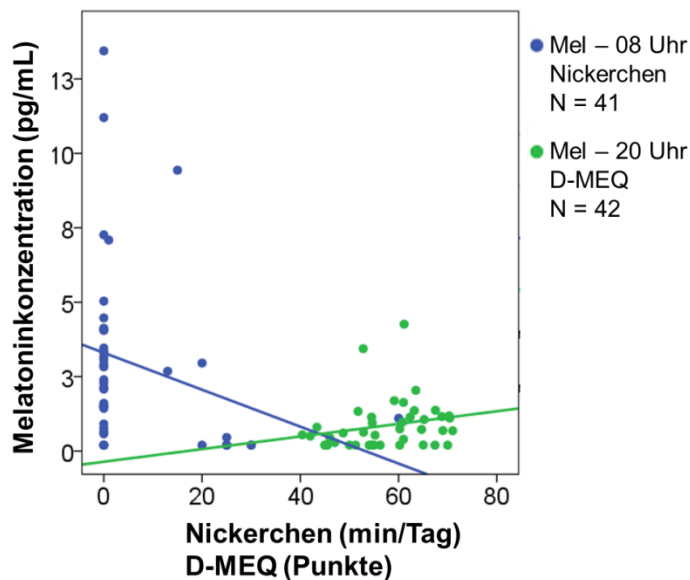


ABB. 37: KORRELATIONEN IN DER GESAMTGRUPPE ZWISCHEN DER MELATONINKONZENTRATION UND NICKERCHEN BZW. DER MORGENPRÄFERENZ. Mel = Melatoninkonzentration (pg/mL), D-MEQ = Fragebogen zur Ermittlung der Morgen-/Abendpräferenz

7.4.5 ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN DEN LEBENSSTIL BETREFFENDEN VARIABLEN UND OXIDATIVEM STRESS

Verschiedene Parameter, die den Lebensstil betreffen, beeinflussen möglicherweise den OS. Deshalb werden in diesem Abschnitt Korrelationen zwischen dem OS und solchen Variablen dargelegt. Auch hier wird zuerst die Gesamtgruppe betrachtet und im Anschluss die beiden Altersgruppen getrennt voneinander.

Zwischen dem subjektiv empfundenen Stress (Stressfragebogen) und dem OS bestehen in der Gesamtgruppe ausschließlich negative Zusammenhänge mit schwacher Effektstärke. Signifikante Befunde bestehen nicht (Anhang A16.29). In beiden Altersgruppen treten positive wie negative Zusammenhänge auf (Anhang A16.30). Diese zeigen nur schwache bis mittlere Effekte. Signifikante Zusammenhänge sind nicht zu beobachten.

Dasselbe gilt auch für den Zusammenhang zwischen dem OS und der Lebenszufriedenheit: In allen Gruppen kommen positive wie negative Zusammenhänge vor, die überwiegend

schwache Effekte zeigen (Anhang A16.29 und A16.30). Bei den Älteren besteht um 20 Uhr ein mittlerer Effekt ($N = 21$, $r = 0,412$, $p = 0,063$), der jedoch nicht signifikant ist.

Auch weitere den Lebensstil betreffende Parameter wie die Schlafqualität, Tagesschläfrigkeit, Ernährungsgewohnheiten wie Kaffee- und Alkoholkonsum, Obst- und Gemüseverzehr, Aktivität und Sport sowie Zeit im Freien zeigen weitestgehend keine signifikanten Korrelationen zum OS (Anhang A16.31-16.32). Ausnahmen bilden die Sportstundenanzahl pro Woche ($N = 42$, $r_s = -0,331$, $p = 0,032$) und der körperliche Aktivitätsgrad ($N = 42$, $r_s = -0,311$, $p = 0,045$), die in der Gesamtgruppe bei mittlerer Effektstärke einen signifikant negativen Zusammenhang mit der oxidativen Stresskonzentration um 20 Uhr zeigen (A16.31). Auch der Kaffeekonsum zeigt in der Gesamtgruppe bei mittlerer Effektstärke eine signifikante Korrelation mit der oxidativen Stresskonzentration um 20 Uhr ($N = 42$, $r_s = 0,311$, $p = 0,045$). Bei den älteren Frauen korrelieren die Sportstunden pro Woche ebenfalls negativ mit dem OS um 20 Uhr ($N = 21$, $r_s = -0,520$, $p = 0,016$) sowie zusätzlich mit dem Mittelwert der oxidativen Stresskonzentration ($N = 21$, $r_s = -0,451$, $p = 0,040$). Bei den jüngeren Probandinnen sind alle genannten Variablen ohne signifikanten Zusammenhang zur Konzentration an oxidativem Stress (A16.32).

Der BMI zeigt in der Gesamtgruppe einen positiven Zusammenhang mit dem mittleren OS-Wert ($N = 42$, $r_s = 0,353$, $p = 0,022$) (Abb. 38). Dieser hat eine mittlere Effektstärke und ist signifikant (A16.33). Während bei den jüngeren Probandinnen zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem BMI und dem OS besteht, zeigen die älteren zu allen Zeitpunkten positive Zusammenhänge, die statistisch signifikant sind (A16.34). Dabei sind die Korrelationen zwischen OS und BMI bei den Älteren ($N = 21$) um 08 Uhr ($r = 0,615$, $p = 0,003$), 12 Uhr ($r = 0,618$, $p = 0,003$), 16 Uhr ($r = 0,556$, $p = 0,009$) sowie im Mittel über den Tag ($r = 0,666$, $p = 0,001$) sehr signifikant und um 20 Uhr ($r = 0,465$, $p = 0,034$) signifikant.

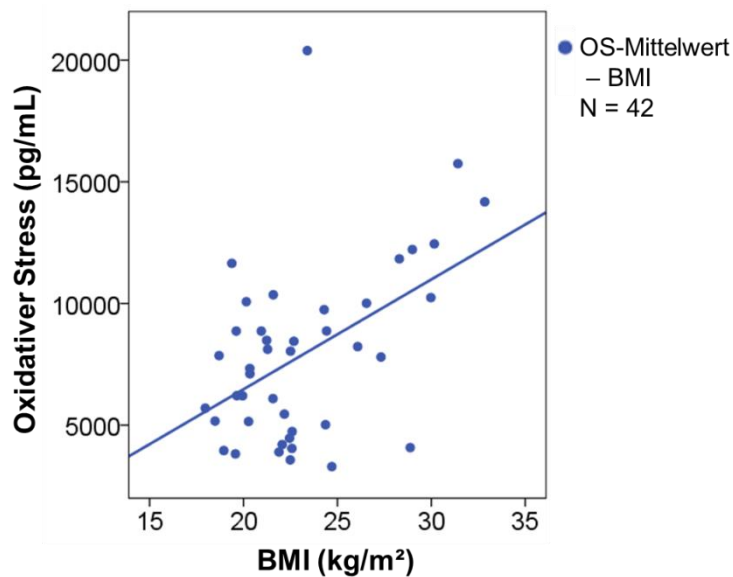


ABB. 38: KORRELATIONEN IN DER GESAMTGRUPPE ZWISCHEN DEM OXIDATIVEN STRESS (OS) UND DEM BODY-MASS-INDEX (BMI).

7.4.6 ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN LEBENSSTIL-PARAMETERN

Einige Parameter, die den Lebensstil betreffen, zeigen ihrerseits Korrelationen untereinander. Diese werden im Folgenden vorgestellt.

LEBENSZUFRIEDENHEIT: Eine Korrelationsanalyse zeigt, dass ein negativer Zusammenhang ($N = 42$, $r = -0,613$, $p < 0,001$) zwischen dem subjektiv empfundenen Stress (Perceived stress scale) und der Lebenszufriedenheit besteht. Dieser hat eine starke Effektstärke und ist hoch signifikant. Dies bedeutet, je höher der Stress empfunden wird, desto geringer ist die Lebenszufriedenheit. Unterteilt man die Altersgruppen, wird deutlich, dass dies besonders bei den älteren Probandinnen zutrifft. Während bei den jüngeren Probandinnen ein negativer Zusammenhang mit mittlerer Effektstärke erkennbar ist, der jedoch nicht signifikant ist ($N = 21$, $r = -0,362$, $p = 0,149$), besteht innerhalb der älteren Gruppe ein hoch signifikanter Zusammenhang ($N = 21$, $r = -0,764$, $p < 0,001$). Dies ist in Abb. 39 dargestellt.

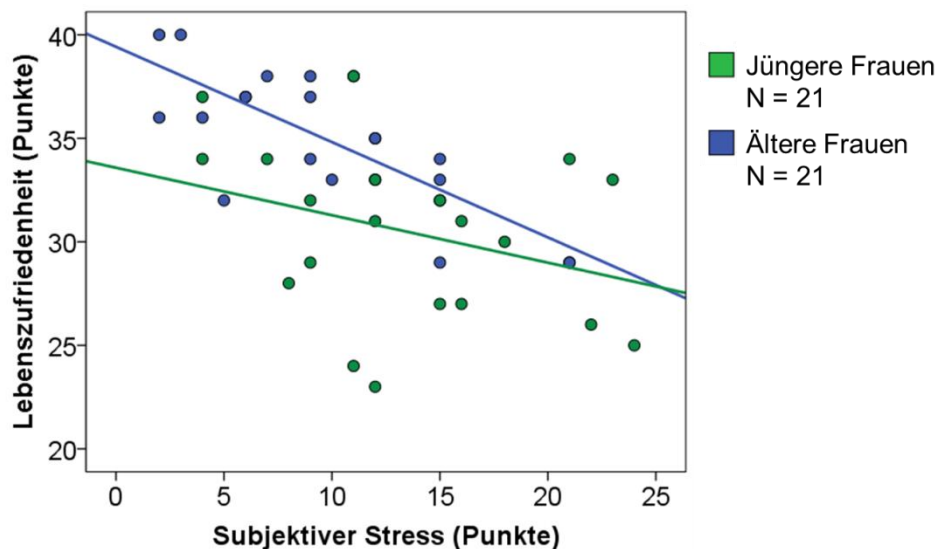


ABB. 39: KORRELATIONEN ZWISCHEN DEM SUBJEKTIVEN STRESS UND DER LEBENSZUFRIEDENHEIT BEI JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN

SCHLAFQUALITÄT: Die mit dem PSQI ermittelte Schlafqualität zeigt in der Gesamtgruppe sowie bei den älteren Probandinnen keine signifikanten Zusammenhänge mit der körperlichen Aktivität und der Sportmenge, der Zeit im Freien und den Nickerchen am Tage (A16.35-16.37). Bei den jüngeren Probandinnen hingegen besteht eine positive Korrelation zwischen der Schlafqualität und der Zeit im Freien an freien Tagen (Freizeit) (N = 21, $r = 0,480$, $p = 0,028$). Die Effektstärke ist dabei mittel und der Zusammenhang signifikant.

CHRONOTYP: Ein Zusammenhang zwischen dem Chronotyp und der Uhrzeit der ersten zwei Temperatur-Nachtpeaks wäre denkbar (A16.38-16.39). Demnach würden Morgentypen bzw. Probandinnen mit einem hohen Punktwert beim D-MEQ die ersten zwei Nachtpeaks früh erreichen. Ein solcher Effekt ist jedoch in der Gesamtgruppe schwach und der Zusammenhang statistisch nicht signifikant (1. Nachtpeak: N = 42, $r = -0,190$, $p = 0,229$, 2. Nachtpeak: N = 41, $r = -0,234$, $p = 0,140$).

7.4.7 ZUSAMMENHÄNGE MIT DEM ALTER

Das Alter wirkt sich in der Gesamtgruppe auf viele Variablen deutlich aus. Die Körperhöhe sinkt mit zunehmendem Alter bei mittlerer Effektstärke sehr signifikant (N = 42, $r_s = -0,396$, $p = 0,009$). Die Zunahme des Körpergewichts mit dem Alter hingegen zeigt einen schwachen Effekt und ist nicht signifikant (N = 42, $r_s = 0,101$, $p = 0,526$), dafür zeigt jedoch die Zunahme des BMI einen mittleren Effekt und der BMI steigt mit dem Alter signifikant an (N = 42,

$r_s = 0,389$, $p = 0,011$). Der Zusammenhang zwischen dem Alter und der Expression des *hBmal1*-Gens zeigt um 16 Uhr einen starken Effekt und ist signifikant positiv ($N = 20$, $r_s = 0,520$, $p = 0,019$). Zwischen dem Alter und der Expression des *hSod1*-Gens, der SOD1-Protein-Konzentration, der Melatoninkonzentration oder dem OS-Wert gibt es positive und negative Zusammenhänge mit teils schwachen und mittleren Effektstärken. Die Zusammenhänge in der Gesamtgruppe sind jedoch alle nicht signifikant (Anhang A16.40-16.46).

Zwischen der Konzentration an oxidativem Stress und dem Alter bestehen bei den jüngeren Frauen ausschließlich negative Zusammenhänge. Diese zeigen zu allen vier Messzeiten starke Effekte und sind (teils sehr) signifikant (Anhang A16.47). Auch bei den älteren Frauen sind alle Zusammenhänge zwischen dem Alter und dem OS negativ. Die Effektstärken sind jedoch nur schwach bis mittel und es gibt keine signifikanten Korrelationen.

Für die weiteren Lebensstil-bezogenen Merkmale wurden beide Altersgruppen gemeinsam zu einer Gesamtgruppe zusammengefasst, um eine größere Altersspanne abzudecken (Anhang A16.48). Der subjektiv empfundene Stress nimmt mit zunehmendem Alter bei mittlerem Effekt signifikant ab ($N = 42$, $r_s = -0,360$, $p = 0,019$) und gleichzeitig steigt die Lebenszufriedenheit bei starkem Effekt hoch signifikant ($N = 42$, $r_s = 0,526$, $p < 0,001$). Die Schlafgewohnheiten in Form der Schlafqualität sowie der Tagesschläfrigkeit zeigen keine signifikanten Zusammenhänge mit dem Alter. Weder körperliche Aktivität und Sport noch die Zeiträume im Freien verändern sich mit dem Alter signifikant. Der Gesundheitszustand wird gemäß der Selbsteinschätzung mit zunehmendem Alter bei mittlerer Effektstärke signifikant besser bewertet ($N = 42$, $r_s = 0,347$, $p = 0,025$). Die Ernährungsgewohnheiten hinsichtlich Obst- und Gemüseverzehr sowie Alkoholkonsum zeigen keine signifikanten Zusammenhänge mit dem Alter. Allerdings besteht ein starker Effekt und ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Kaffee-/ Schwarzteeconsum und dem Alter ($N = 42$, $r_s = 0,717$, $p < 0,001$).

Grauer Star ist eine altersbedingte Augenkrankheit und könnte in Zusammenhang mit BMAL1 stehen, wenn dieses Protein altersbedingte Veränderungen verhindert (Kondratov *et al.* 2006). Für diese Studie wurde untersucht, ob bei den Älteren ein Zusammenhang zwischen der *hBmal1*-Expression und diagnostiziertem Grauen Star besteht. Der beobachtete Zusammenhang ist überwiegend negativ und der Effekt schwach bis mittel bzw. um 20 Uhr

sogar stark ($N = 11$, $r_s = -0,520$, $p = 0,101$). Es konnten jedoch keine signifikanten Zusammenhänge gezeigt werden (Anhang A16.49).

8 DISKUSSION

8.1 UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN ALTERSGRUPPEN IN BEZUG AUF CIRCADIANE MERKMALSSYSTEME

In der folgenden Diskussion werden die beschriebenen Ergebnisse im Einzelnen diskutiert und in Bezug auf die Leitfragen beleuchtet. Die erste Frage beschäftigt sich mit den Unterschieden zwischen jüngeren und älteren Frauen bezüglich circadianer Merkmalsysteme. Hierzu werden die circadianen Rhythmen der in dieser Studie untersuchten Merkmale mit bisherigen Forschungsergebnissen verglichen und die Altersgruppenunterschiede diskutiert. Die Körpertemperatur wird als starker circadianer Marker angesehen und deshalb als erstes Merkmal besprochen. Es folgen die Gene *hBmal1* und *hSOD1* sowie das SOD1-Protein. Abschließend werden die Rhythmen von OS sowie Melatonin diskutiert.

8.1.1 KÖRPERKERNTemperatur UND PERIPHERE HAUTTEMPERATUR

Das Temperaturminimum der Körperkerntemperatur liegt bei den jüngeren Probandinnen um 4 Uhr nachts und stimmt mit Literaturbefunden überein (Aschoff 1955; Kräuchi *et al.* 2000). Das KKT-Minimum der Älteren wurde um 24 Uhr gemessen, wobei es jedoch etwas später liegen könnte, da Literaturbefunde dies nahelegen (Monk u. Kupfer 2000). Dies konnte aufgrund der Messung im 4-Stunden-Takt zeitlich nicht genauer eingegrenzt werden. Mit Sicherheit erreichten die älteren Probandinnen das Minimum der KKT früher als die jüngeren, was mit einer früheren Phasenlage der älteren Probandinnen erklärbar ist. Dies steht in Einklang mit früheren Studien (Duffy *et al.* 1998). Die älteren Probandinnen haben laut D-MEQ-Fragebogen eine größere Morgenpräferenz als die jüngeren, welche sich in der früheren Phasenlage der KKT der Älteren widerspiegelt. Auch dies bestätigen Literaturbefunde (Duffy *et al.* 1998; Hofman u. Swaab 2006).

Die circadiane Rhythmik der peripheren Hauttemperatur ist bei den älteren Probandinnen deutlich schwächer. So ist die Amplitude bei den Älteren niedriger (n.s.) ausgeprägt. Diese Abnahme der circadianen Rhythmik der Hauttemperaturkurve ist ein zentraler Marker des Alterns (Mathew *et al.* 1986). Bei beiden Altersgruppen erreicht die periphere Hauttemperatur ihr Maximum um 04 Uhr nachts. Diese Ergebnisse decken sich sehr gut mit Laborbefunden von Kräuchi und Kollegen (Kräuchi u. Wirz-Justice 1994; Kräuchi 2002), denen

zufolge das Maximum in der nächtlichen Schlafphase liegt. Auch das Minimum der Jüngeren um 20 Uhr steht in Einklang mit Kräuchis Erkenntnissen, nach denen das Minimum der peripheren Hauttemperatur am Ende der aktiven Phase liegt (Kräuchi 2002; Kräuchi u. Wirz-Justice 1994). Bei den Älteren hingegen liegt das Minimum erst um 08 Uhr morgens. Durch die deutliche Abflachung der Kurve insbesondere am Übergang zur Nacht hin, erreicht der abendliche Wert kein Minimum, sodass dieses nun am Morgen liegt.

8.1.2 KURVENVERLÄUFE VON *hBMAL1*- UND *hSOD1*-MRNAS SOWIE SOD1-PROTEIN

KURVENVERLAUF VON *hBMAL1*-GEN

Die Menge an *hBmal1*-mRNA variiert im Tagesverlauf und zeigt eine ausgeprägte circadiane Rhythmik (Archer *et al.* 2008). Diese stark ausgeprägte Rhythmik kann große interindividuelle Unterschiede aufweisen, sodass die Phasenlage sehr unterschiedlich ist (Archer *et al.* 2008). Hinzu kommt eine circannuale Rhythmik mit einer erhöhten Expression im Sommer und einer erniedrigten Expression im Winter (Dopico *et al.* 2015). Aufgrund der jahreszeitlichen Schwankungen wurden die Probandinnen dieser Studie ausschließlich in den Frühjahrsmonaten März bis Mai sowie in den Herbstmonaten September bis Oktober untersucht, in denen die *hBmal1*-Expression auf einem mittleren Niveau liegt. Die *hBmal1*-mRNA zeigt eine circadiane Rhythmik mit niedrigen Werten am Morgen und hohen Werten in der zweiten Nachthälfte. Hierbei überrascht, dass die Peaks für ältere und jüngere Probandinnen um 04 Uhr nachts liegen. Bisherige Studien lieferten unterschiedliche Angaben zum Zeitpunkt der maximalen *hBmal1*-mRNA Konzentration, doch in den meisten Studien lag selbiger bei etwa 21 Uhr abends (Ando *et al.* 2010; Bjarnason *et al.* 2001; Leibetseder *et al.* 2009). Dabei wurden jedoch unterschiedliche Gewebe und Geschlechter untersucht. Eine Studie an Ratten zeigte, dass der circadiane Rhythmus von *Bmal1* mit dem Alter schwächer wird (Lacoste *et al.* 2017). Dies lässt sich in der vorliegenden Studie für den Menschen nicht bestätigen.

KURVENVERLAUF VON *hSOD1*-GEN

Die Konzentration an *hSod1*-mRNA zeigt bei den jüngeren sowie bei den älteren Probandinnen eine circadiane Rhythmik. Es wurden eine rhythmische mRNA-Expression sowie eine rhythmische Enzymaktivität in Mäusen und Ratten gezeigt (Hodoğlugil *et al.* 1995; Jang *et al.* 2011; Jiménez-Ortega *et al.* 2010). Xu und Kollegen (2012) zeigten in ihrer Studie eine circadiane Rhythmik der *hSod1*-Expression in Leberzellen von Mäusen. Der mRNA-Peak für *hSod1* lag bei den Mäusen um 18 Uhr und somit am Übergang von der inaktiven zur aktiven

Phase. In der vorliegenden Studie wurde die größte Expression um 24 Uhr gemessen, sodass der Peak bei Menschen in der inaktiven Phase liegt. Bisherige humane Studien beziehen sich überwiegend auf die Aktivität der SOD1, die sich nicht mit der Expression gleichsetzen lässt. Hierbei variieren die Angaben zum Zeitpunkt der maximalen Aktivität deutlich: Während Luo und Kollegen (1997) den Peak der SOD1 bei 21:17 Uhr detektierten, lag der Aktivitätspeak bei Singh und Kollegen um etwa 07 Uhr morgens (Singh *et al.* 2005; Singh *et al.* 2003).

KURVENVERLAUF VON SOD1-PROTEIN

Das SOD1-Protein zeigt bei beiden Altersgruppen eine deutliche circadiane Rhythmik. Dies steht in Übereinstimmung mit vorherigen Studien, die gezeigt haben, dass antioxidative Schutzmechanismen wie freie Radikalfänger und antioxidative Enzyme (z. B. SOD1, Katalase, Glutathionperoxidase und Glutathionreduktase) circadian reguliert werden (Culotta *et al.* 2006; Hodoğlugil *et al.* 1995; Hardeland *et al.* 2003; Jang *et al.* 2011). Das Konzentrationsmaximum wurde bei den Jüngeren um 04 Uhr nachts und bei den Älteren um 08 Uhr morgens erreicht. Dies lässt sich nicht mit der früheren Phasenlage der älteren Probandinnen erklären, da dann ihr Konzentrationsmaximum früher liegen müsste als bei den jüngeren. In der Literatur wird das Konzentrationsmaximum des SOD1-Proteins bei weiblichen Rhesusaffen um 10 Uhr und das -minimum bei 22 Uhr angegeben (Goncharova *et al.* 2006). Bei der genannten Studie gab es jedoch nur einen weiteren Messzeitpunkt um 16 Uhr, sodass eine gute Übereinstimmung der Peaks möglich ist.

hSOD1- UND SOD1-KURVENVERLAUF IM VERGLEICH

Interessanterweise ist der Kurvenverlauf der *hSod1*-mRNA im Vergleich zu dem Verlauf der SOD1-Proteinkonzentration um 4 bis 8 Stunden vorgeschoben. Während die *hSod1*-mRNA ihr Maximum in beiden Altersgruppen um 24 Uhr erreicht, liegt das Maximum des SOD1-Proteins bei 04 Uhr (Jüngere) bzw. 08 Uhr (Ältere). Dieses Ergebnis weist auf eine Verzögerung zwischen Transkription und Translation hin. Eine solche zeitliche Verzögerung unterstützt die Darstellung von Jang und Kollegen (2011), der zufolge die SOD1-Aktivität und somit die Proteinmenge direkt mit der Konzentration an mRNA zusammenhängt und die eine transkriptionale Regulation schlussfolgern. Die zeitliche Verschiebung von 4-8 Stunden zwischen den Maxima von *hSod1*-mRNA und SOD1-Protein ist die zur Proteinsynthese benötigte Zeitspanne. Jang und Kollegen (2011) zufolge könnte die SOD1-Expression einer circadianen Regulation unterliegen und durch oxidativen Stress induziert werden. Die

circadiane Rhythmik des SOD1-Proteins nimmt bei weiblichen Rhesusaffen mit zunehmendem Alter ab (Goncharova *et al.* 2006). Dies kann aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie nicht gefolgert werden.

8.1.3 OXIDATIVER STRESS

Der OS ist in beiden Altersgruppen morgens am höchsten und sinkt bis um 20 Uhr kontinuierlich ab. Eine tageszeitliche Rhythmik der ROS-Produktion wurde bereits in verschiedenen Spezies wie Pilzen (Yoshida *et al.* 2011), Pflanzen (Lai *et al.* 2012) und Tieren (Fanjul-Moles 2013) gezeigt. Die ermittelten Unterschiede sind zwischen allen einzelnen Messzeitpunkten signifikant. Ebenfalls signifikant sind die Unterschiede zwischen den beiden Altersgruppen: Zu jedem der vier Messzeitpunkte liegt der mittlere OS-Wert der Jüngeren deutlich und statistisch signifikant unter dem jeweiligen Mittelwert der älteren Probandinnen. Die Ergebnisse zeigen somit, dass 1) der OS-Wert von 08 Uhr am Morgen bis 20 Uhr am Abend unabhängig vom Alter kontinuierlich sinkt und 2) die Werte der Älteren signifikant über denen der Jüngeren liegen. Auch frühere Studien zeigten, dass Produkte, die durch oxidativen Stress und oxidative Schäden entstehen, mit dem Alter akkumulieren (Meli *et al.* 2003; Yu 1993). Überraschend ist, dass der OS im Tagesverlauf abnimmt. Die überragende Menge der ROS entsteht durch metabolische Aktivität, sodass ein Anstieg des OS in der aktiven Phase erwartet wurde. In der nächtlichen Ruhe- und Regenerationsphase hätten die ROS dann eliminiert werden können. Tatsächlich stellt sich das Bild mit hohen Werten zu Beginn der aktiven Phase und niedrigeren Werten am Ende der aktiven Phase jedoch umgekehrt dar. Eine Laborstudie von Kanabrocki und Kollegen (2002) fand bei gesunden Männern eine circadiane Rhythmik in der Produktion von freien Radikalen mit einem Peak um 18 Uhr. Des Weiteren wiesen die Forscher um Kanabrocki 8-Hydroxy-2-Guanosin im Urin der männlichen Probanden nach und ermittelten eine circadiane Rhythmik mit einem Maximum um 18 Uhr. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Freie Radikale und deren Schäden dieselbe Rhythmik aufweisen. Interessanterweise liegt bei den untersuchten Männern der Peak des OS am Abend, wohingegen die höchste OS-Konzentration bei den Frauen in der vorliegenden Studie am Morgen ermittelt wurde.

8.1.4 MELATONIN

8.1.4.1 CIRCADIANE RHYTHMIK VON MELATONIN

Die Rhythmik der Melatoninpeaks dieser Studie stimmt mit vorherigen Untersuchungen überein. Ältere Probanden ab 65 Jahren zeigten in zahlreichen Studien einen Melatonin-Peak im Serum oder Plasma zwischen 02 und 03 Uhr nachts mit Maximalkonzentrationen von 11,2-91,3 pg/mL (z. B. Review Scholtens *et al.* 2016). In den Studien mit Plasma begannen die Melatoninmengen um 18 Uhr anzusteigen und erreichten um 03 Uhr ihren Höhepunkt. Anschließend sank die Melatoninkonzentration bis 10 Uhr ab (Review Scholtens *et al.* 2016).

In der vorliegenden Studie wurden die höchsten Melatoninkonzentrationen für Ältere um 24 Uhr und um 04 Uhr nachts gemessen. Der Peak kann somit um diese beiden Punkten liegen, sodass eine eindeutige Übereinstimmung mit diversen Studien (vgl. Review Scholtens *et al.* 2016) besteht. Auch das Absinken der Melatoninkonzentration bis zum Vormittag zeigt eine vergleichbare Rhythmik wie durch Scholtens und Kollegen (2016) beschrieben. Dass die Melatoninkonzentration der älteren Probandinnen bis 04 Uhr bereits wieder sinkt, während sie bei den jüngeren bis 04 Uhr steigt, lässt sich wie bei der Temperaturkurve mit der früheren Phasenlage und der stärkeren Morgenpräferenz der älteren Probandinnen erklären.

Die Studie von Higuchi und Kollegen (2003) untersuchte im Speichel die Melatoninkonzentration junger männlicher Probanden ($24,7 \pm 5,6$ Jahre) am Abend. Die Werte zeigten einen abendlichen Anstieg der Melatoninkonzentration von 2 pg/mL um 23 Uhr auf 15 pg/mL um 02 Uhr (Higuchi *et al.* 2003). Die jüngeren Frauen dieser Untersuchung zeigten um 24 Uhr eine mittlere Melatoninkonzentration von 5,9 pg/mL und um 04 Uhr von 6,8 pg/mL. Die Werte sind aufgrund der Unterschiede in Geschlecht, Messzeitpunkten sowie Studienbedingungen nur begrenzt vergleichbar. Davon ausgehend, dass der Melatoninpeak zwischen 24 und 05 Uhr nachts liegt (Zeitzer *et al.* 1999; Liu *et al.* 2000; Tamarkin *et al.* 1982), sind deutlich höhere Maximalwerte erwartbar, die zu keinem Messzeitpunkt dieser Studie erfasst wurden.

8.1.4.2 MELATONINEXPRESSION IM VERGLEICH ZWISCHEN JÜNGEREN UND ÄLTEREN FRAUEN

Ab dem Erwachsenenalter sinkt der nächtliche Melatoninpeak mit zunehmendem Alter, wobei die Gesamtmenge über den Tag gleich bleibt (Review Scholtens *et al.* 2016), d. h. die Rhythmik schwächt sich mit zunehmendem Alter ab. Anderen Quellen zufolge kann mit dem Altern die maximale Melatoninkonzentration sowie die Gesamtkonzentration über den Tag verringert

sein (Zhao *et al.* 2002; Karasek u. Reiter 2002). Dabei ist zu beachten, dass es große interindividuelle Unterschiede gibt (Arendt 1988). Es wird angenommen, dass hohe Melatoninkonzentrationen eine positive Rolle für gesundes Altern und Langlebigkeit spielen (Poeggeler *et al.* 1993; Hardeland 2013).

Die Melatoninkonzentration lag entgegen der Erwartung im Mittel bei den älteren Probandinnen höher als bei den jüngeren. Frühere Untersuchungen zeigten, dass die Melatoninkonzentration sowie die Melatoninrhythmik mit dem Alter abnehmen (Zhao *et al.* 2002; Touitou 2001; Sarlak *et al.* 2013) oder der Peak gleich bleibt (Zeitzer *et al.* 1999; Fourtillan *et al.* 2001). Eine Ursache dafür ist ein weniger strukturierter Tagesablauf (mit Nickerchen) älterer Menschen, was unter Umständen zu einer schlechteren Schlafqualität führen kann (Monk *et al.* 2001). Die Schlafqualität älterer Probandinnen ist in dieser Studie mit mittleren 4,7 Punkten erwartungsgemäß etwas schlechter als die der jüngeren Probandinnen mit 4,2 Punkten (n.s.). Um 08 Uhr morgens wurden gemäß der Erwartung höhere Melatoninkonzentrationen bei den jüngeren Probandinnen beobachtet. Die jüngeren Probandinnen hielten sich am Versuchstag in der Zeit von 06 Uhr morgens bis 16 Uhr nachmittags im Mittel 80 min im Freien auf und waren infolgedessen deutlich mehr Blaulicht ausgesetzt als die älteren, die sich in demselben Zeitraum im Mittel nur 40 min im Freien aufhielten. Da Blaulicht die Melatoninsynthese über eine Hemmung der AANAT inhibiert (Klein *et al.* 1996), erklärt dies, dass die Melatoninkonzentration der jüngeren Probandinnen um 12 Uhr und um 16 Uhr unter der der älteren liegt. Ab 20 Uhr sowie in der Nacht wären nach dem Beginn der Melatoninsynthese, die etwa drei Stunden vor der gewohnten Zu-Bett-Geh-Zeit einsetzt, deutlich höhere Werte bei den Jüngeren als bei den älteren Probandinnen zu erwarten gewesen. Es ist bekannt, dass die Melatoninsynthese durch Licht unterdrückt wird (Lewy *et al.* 1980). Alle Probandinnen mussten für die nächtlichen Sammlungen um 04 Uhr die Beleuchtung einschalten. Hierbei reagierten die jüngeren Probandinnen vermutlich stärker auf die Störung der nächtlichen Dunkelheit, sodass die Melatoninsynthese bei ihnen effektiver unterdrückt wurde als bei älteren Probandinnen. Dies würde erklären, wieso die nächtlichen Melatoninpeaks bei den Älteren höher waren als bei den Jüngeren. Herljevic und Kollegen (2005) zeigten, dass bei älteren Frauen der Melatonin-unterdrückende Effekt von Blaulicht durch eine altersbedingte Veränderung der Linse deutlich verringert war.

8.1.5 BEANTWORTUNG DER 1. LEITFRAGE

Die erste Leitfrage dieser Studie befasst sich mit dem Auftreten von Unterschieden in circadianen Merkmalssystemen bei jüngeren und älteren Frauen.

Die Kurven der peripheren Hauttemperatur zeigten, dass Minimum (n.s.) und Maximum (hoch signifikant) bei den Älteren weniger stark ausgeprägt sind und die Amplitude (n.s.) infolgedessen verringert ist, sodass die circadiane Rhythmik mit dem Alter schwächer wird. Die Genexpressionskurven von *hBmal1* und *hSod1* verlaufen bei jüngeren und älteren Probandinnen sehr ähnlich d. h. Minima und Maxima werden zu sehr ähnlichen Zeitpunkten erreicht. Die Genexpression war bei den Älteren bei beiden Genen deutlich und teils signifikant höher als bei den Jüngeren. Auf der Proteinebene finden sich leichte zeitliche Verschiebungen in der Rhythmik, wodurch Minimum und Maximum bei den Jüngeren etwas früher liegen als bei den Älteren. Auch die Expressionsstärke über den Tag ist leicht unterschiedlich. Die Proteinsynthese ist bei den Älteren von 8-16 Uhr höher (n.s.) als bei den Jüngeren, wohingegen die Jüngeren von 20-04 Uhr (n.s.) eine höhere Synthese aufweisen.

Der Verlauf der OS-Rhythmik zeigte über den Tag bei jüngeren und älteren Frauen eine signifikante Konzentrationsabnahme von 08 bis 20 Uhr. Dabei lagen die Werte der älteren Frauen zu jedem Messzeitpunkt signifikant über denen der jüngeren. In Bezug auf die Melatoninkonzentration zeigten beide Altersgruppen stark ausgeprägte circadiane Rhythmen, wobei die Konzentration der älteren Frauen teils signifikant über der der jüngeren lag. Minima und Maxima lagen auch hier zwischen den Altersgruppen zeitlich nah beieinander, wobei der maximal gemessene Wert bei den älteren Frauen früher auftrat, was auf eine frühere Phasenlage hindeutet.

Während die Werte und Grafiken durchaus Unterschiede zwischen den Altersgruppen nahelegen, konnten Korrelationen der Variablen mit dem Alter nicht statistisch abgesichert werden. Dies gilt neben der Expression des *hSod1*-Gens, der SOD1-Protein-Konzentration und der Melatoninkonzentration auch für die oxidative Stresskonzentration. Besonders letzteres ist überraschend, da aus zahlreichen Literaturquellen (Zhao *et al.* 2002; Karasek u. Reiter 2002) bekannt ist, dass der OS im Alter zunimmt, sodass hier eine positive Korrelation erwartet wurde.

Circadiane Rhythmen nehmen mit zunehmendem Alter ab (Nakamura *et al.* 2011; Sack *et al.* 1986). In dieser Studie ist dies besonders bei der peripheren Körperkerntemperatur sehr gut

erkennbar. Unter Annahme einer Abschwächung circadianer Rhythmen wäre zu erwarten, dass auch die Melatoninrhythmik, die *hBmal1*-Rhythmik sowie die *hSod1/SOD1*-Rhythmik weniger ausgeprägt wären. Dies ließ sich nicht bestätigen, da die Spannweiten zwischen den kleinsten und den größten Werten von *hBmal1*, *hSod1*, SOD1, OS und Melatonin bei den älteren Frauen größer waren als bei der jüngeren Vergleichsgruppe. Dies könnte unter anderem darauf zurückzuführen sein, dass die Varianz und damit die Streuung der Werte mit dem Alter zunehmen.

Insgesamt zeigen sich in Hinblick auf alle circadianen Mermalssysteme teils sehr signifikante Unterschiede zwischen den beiden Altersgruppen. Diese weisen darauf hin, dass es im Rahmen des Alternsprozesses zu diversen Veränderungen in der circadianen Rhythmik kommt. Ob diese Veränderungen das Altern auslösen oder ihrerseits durch das Altern induziert werden, bleibt in weiteren Untersuchungen zu klären.

8.2 ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN DEN CIRCADIANEN MERKMALEN

Die zweite Fragestellung befasst sich mit etwaigen Zusammenhängen zwischen den einzelnen circadianen Merkmalen bei jüngeren und älteren Frauen. Konkret behandelt werden an dieser Stelle mögliche Zusammenhänge zwischen *hBmal1*- und *hSod1*-Genexpression, SOD1-, OS- und Melatoninkonzentration.

8.2.1 ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN *hBMAL1*- UND *hSOD1*-MRNAS UND SOD1-PROTEIN

hBMAL1-GEN – *hSOD1*-GEN

Gemäß der in der Fragestellung aufgeführten Annahme ermöglicht die Bindung von BMAL1/CLOCK Heterodimeren an das E-Box-Element in der Promotorregion Uhrengenerierter Gene die Transkription des *hSod1*-Gens. Die tageszeitlichen Konzentrationen der mRNA von *hBmal1* und *hSod1* zeigen sehr ähnliche Verläufe mit Maxima in der Nacht und Minima am Morgen oder Vormittag. Die Korrelationsanalysen ergaben (hoch-)signifikante Zusammenhänge der mRNA-Mengen zu den einzelnen Messzeitpunkten. Dies stützt die Hypothese, dass BMAL1 als TF die Synthese von *hSod1*-mRNA beeinflusst, indem CLOCK/BMAL1 an das regulatorische E-Box Element des *hSod1*-Gens bindet. Zu erwarten gewesen wäre eine kleine Verzögerung zwischen den Peaks der mRNA von *hBmal1* und *hSod1*: Die *hBmal1*-mRNA muss zuerst in die BMAL1 Proteinform translatiert und dieses Produkt in den Zellkern transloziert werden. Erst danach können BMAL1-Proteine im Verbund mit CLOCK

als Heterodimere an regulatorische Einheiten Uhrengen-kontrollierter Gene binden und deren Transkription aktivieren. Die Konzentrationspeaks der *hSod1*-mRNA liegen bei beiden Altersgruppen um 24 Uhr, während der *hBmal1* Konzentrationspeak bei beiden Altersgruppen jedoch erst um 04 Uhr nachts liegt. Wenn BMAL1/CLOCK-Dimere tatsächlich die Transkription der *hSod1* auslösen, dann dürften demzufolge bereits geringe BMAL1-Proteinmengen ausreichen, um die Transkription der CCGs zu ermöglichen.

HSOD1-GEN – SOD1-PROTEIN

Laut Jang und Kollegen (2011) wird die SOD1-Aktivität direkt über die Proteinbiosynthese gesteuert. Demzufolge wird weder die mRNA zwischengelagert, noch das Protein inaktiv gespeichert. Der Transkription folgt unmittelbar die Translation und infolgedessen steigt die SOD1-Aktivität. Diesen Befund betrachtend wären positive Zusammenhänge zwischen der *hSod1*-mRNA und dem SOD1-Protein zu einem oder zwei aufeinander folgenden Zeitpunkten zu erwarten gewesen. Allerdings konnte eine solche signifikant positive Korrelation ausschließlich bei der Gruppe der jüngeren Probandinnen nachts um 24 Uhr beobachtet werden. Im Kontrast dazu stehen signifikant negative Korrelationen in der Gesamtgruppe sowie bei den älteren Probandinnen, denen zufolge eine hohe Genexpression zu niedrigen Proteinkonzentrationen führt. Insgesamt bestehen sehr wenige Korrelationen zwischen mRNA- und Proteinkonzentration. Dies legt nahe, dass es entgegen der Erwartung weitere Einflussfaktoren oder andere Regulationsmechanismen auf dem Weg vom Gen zum Protein geben könnte. Darüber hinaus muss in Betracht gezogen werden, dass die unvollständige Analyse der mRNA möglicherweise zu Diskrepanzen führt und bei vollständigem Datensatz ein aussagekräftigeres Ergebnis erhalten worden wäre.

Die (teils hoch) signifikanten positiven Korrelationen der SOD1-Proteinkonzentrationen zwischen den einzelnen Zeitpunkten zeigt, dass eine hohe Proteinkonzentration zu einem Zeitpunkt eine ebenfalls hohe Proteinkonzentration zu den anderen fünf Messzeitpunkten mit sich bringt, d. h. die Werte der einzelnen Probandinnen insgesamt über alle sechs Messzeitpunkte hoch bzw. niedrig im Vergleich zur Gesamtgruppe waren.

8.2.2 ZUSAMMENHÄNGE MIT OXIDATIVEM STRESS

OXIDATIVER STRESS UND SOD1-PROTEIN

Interessanterweise finden sich in den Tagesverläufen von SOD1-Protein und OS klare Übereinstimmungen. Beide sinken von 08 Uhr morgens bis 20 Uhr abends ab, wobei der stärkste Abfall zwischen 08 und 12 Uhr verzeichnet wurde. Trotz der sich ähnelnden circadianen Rhythmik bestehen keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen dem OS und dem SOD1-Protein. Andere Studien zeigten jedoch einen starken Zusammenhang zwischen SOD1-Mutationen und gesteigerten OS-Konzentrationen sowie einer verringerten Lebenserwartung (Hinerfeld *et al.* 2004; Huang *et al.* 2002). Da das SOD1-Protein OS entgegenwirkt, ist es logisch nachvollziehbar, dass die circadianen Rhythmen sich ähneln. Bei Anwesenheit vieler freier Radikale kann eine hohe Präsenz der SOD1 diese in weniger reaktive Produkte umwandeln, um Folgeschäden zu verhindern. Sollte sich evolutiv herausgeprägt haben, dass der OS morgens besonders hoch und abends eher niedrig ist, wäre eine Anpassung der SOD1 evolutiv sinnvoll. Die circadiane Rhythmik der SOD1, die mit der Rhythmik der oxidativen Stresskonzentration übereinstimmt, zeigt, dass das Enzym nicht allgegenwärtig in gleicher Konzentration vorliegt und unterschiedlich stark aktiviert wird. Stattdessen erfolgt die Regulation mittels bedarfsspezifischer Neusynthese. Unklar ist jedoch, ob eine hohe Konzentration an OS, die Synthese von SOD1 induzieren kann. Studien haben gezeigt, dass die SOD1-Aktivität bei intensiven Sporteinheiten kurzzeitig ansteigt. Ob dies mit einer Neusynthese einhergeht, ist ebenso unklar, wie die Frage, ob die circadiane Rhythmik der SOD1 sich tatsächlich nach der OS-Konzentration richtet.

Dittmar *et al.* (2008) beschrieben eine statistisch signifikant negative Korrelation zwischen der SOD1-Aktivität und oxidativen DNA-Schäden. Die SOD1-Aktivität war dabei bei älteren Probanden leicht – aber nicht statistisch signifikant – erniedrigt (gegenüber der jüngeren Kontrollgruppe). In dieser Studie hingegen lag die maximale Proteinkonzentration der älteren Frauen deutlich aber nicht signifikant über der der jüngeren Frauen. Studien über den Alternsprozess von Mäusen haben gezeigt, dass die SOD1-Aktivität in allen Geweben mit dem Alter anstieg (Cristiano *et al.* 1995). Dies würde zu den in dieser Studie ermittelten Befunden mit einem altersbedingten Anstieg der SOD1-Konzentration passen. Unstrittig ist, dass die SOD1 mit der Lebenserwartung in direktem Zusammenhang steht: Während SOD1-Mutationen bei Mäusen zu einer verringerten Lebensdauer führt (Hinerfeld *et al.* 2004; Huang

et al. 2002), kann Überexpression von SOD die Lebensdauer von Hefen verlängern (Fabrizio *et al.* 2003; Harris *et al.* 2003). Der einfachste Erklärungsansatz für die Lebensverlängerung durch SOD-Überexpression beruht auf direkter Reduzierung des OS mittels SOD-Aktivität. Alternativ kommt eine Veränderung der ROS-Signalwege infrage (Landis u. Tower 2005). Ob diese Annahmen auch bei Menschen zutreffen, ist bislang nicht geklärt.

OXIDATIVER STRESS UND MELATONIN

Zwischen dem OS und Melatonin wären nach bisherigem Kenntnissstand sowohl positive wie auch negative Korrelationen denkbar. Melatonin wirkt aktivitätssteigernd auf die SOD1 (Ozturk *et al.* 2000) und reguliert bzw. erhöht die mRNA-Konzentration des *Sod1*-Gens (Antolín *et al.* 1996; Kotler *et al.* 1998). Folglich könnten hohe Melatoninwerte zu hohen *hSod1*-mRNA Konzentrationen und infolgedessen zu hohen SOD1-Proteinkonzentrationen führen. Letztere senken die Konzentration an OS, sodass ein negativer Zusammenhang zwischen Melatonin und dem OS bestünde. Im Umkehrschluss wäre jedoch auch denkbar, dass hohe Konzentrationen an OS zu gesteigerten Melatoninwerten führen, die daraufhin über oben genannte Signalvermittlung zu einer Erhöhung der SOD1-Konzentration führen. In diesem Fall wäre eine positive Korrelation zwischen OS und Melatonin möglich. Die circadianen Rhythmen von OS und Melatonin zeigen, dass diese im Tagesverlauf gegenläufig sind. Während die Melatoninwerte im Laufe des Tages von morgens bis abends ansteigen, sinken die OS-Werte von morgens bis abends kontinuierlich ab, sodass hohe Melatoninwerte am Abend mit niedrigen OS Werten zusammenfallen. Dies lässt eine negative Korrelation wahrscheinlicher erscheinen. In dieser Studie wurden sowohl signifikant positive als auch signifikant negative Korrelationen zwischen OS und Melatonin gefunden. In der Gesamtgruppe sowie in der jüngeren Altersgruppe fanden sich je zwei signifikant positive Korrelationen, während bei den älteren Probandinnen drei signifikant negative Zusammenhänge vorlagen. Der Literatur zufolge reduziert Melatonin nachweislich den OS (vgl. Review Galano *et al.* 2011). Die mit dem Alter abnehmende Melatoninrhythmik und -konzentration trägt zu einem Anstieg der oxidativen Stresskonzentration bei. Einerseits steht weniger Melatonin als direktes Antioxidans zur Verfügung und andererseits ist die durch Melatonin vermittelte Aktivierung antioxidativer Enzyme wie der SOD1 verringert (Reiter *et al.* 2014).

8.2.3 ZUSAMMENHÄNGE MIT MELATONIN

MELATONIN UND *hBMAL1*-GEN

Neben seiner Rolle für die Synthese antioxidativer Enzyme scheint Melatonin auch die Bildung zahlreicher Uhrengene zu kontrollieren. Die Konzentrationspeaks von Melatonin und *hBmal1*-mRNA liegen beide zwischen 04 und 24 Uhr. Melatonin bindet im *Pars tuberalis* der Hypophyse an MT1 Rezeptoren und reguliert darüber die Uhrengenexpression. Bei MT1 *Knock out* Mäusen wurden stark verringerte RNA-Expressionsraten der Uhrengene *mPer1*, *mCry*, *mClock* und *mBmal1* detektiert (Gall *et al.* 2005). In den Zellen der *Pars tuberalis* definiert die Dauer der nächtlichen Melatoninsekretion die Phase und die Amplitude der rhythmischen Uhrengenexpression in Hamstern (Messenger *et al.* 2000; Messenger *et al.* 1999) und Schafen (Lincoln *et al.* 2003). Diese Befunde lassen vermuten, dass Individuen mit einer hohen Melatoninexpression ebenfalls hohe *Bmal1*-mRNA-Konzentrationen aufweisen. Diese Annahme wird durch die vorliegenden Daten unterstützt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass hohe Melatoninkonzentrationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten sowie der Melatoninmittelwert mit hohen *hBmal1*-Peaks um 04 Uhr nachts einhergehen. Dies ist besonders stark in der Gesamtgruppe ausgeprägt. Bei getrennter Betrachtung der beiden Altersgruppen ist der Zusammenhang bei den älteren Probandinnen stärker ausgeprägt, was auf höhere Melatonin- und *hBmal1*-Werte in dieser Altersgruppe zurückzuführen sein könnte. Die signifikant positive Korrelation zwischen dem Alter und der *hBmal1* mRNA-Konzentration um 16 Uhr zeigt, dass höheres Alter möglicherweise zu einer höheren *hBmal1*-mRNA-Konzentration am Nachmittag führen könnte. Hier bleibt jedoch nachzuweisen, dass tatsächlich ein kausaler Zusammenhang zwischen den hier beschriebenen Variablen besteht.

Melatonin vermittelt circannuale Variationen in Metabolismus und Reproduktion. Auch die *hBmal1*-Expression zeigt eine jahreszeitliche Rhythmik mit hohen Werten im Sommer und niedrigen Werten im Winter (Dopico *et al.* 2015). Diese geht einher mit hohen Melatoninwerten im lichtarmen Winter und niedrigen Melatoninwerten im lichtintensiven Sommer. Interessanterweise steht dem negativen Zusammenhang der circannualen Rhythmik zwischen Melatonin und *hBmal1*-Konzentrationen, der oben beschriebene positive Zusammenhang in der circadianen Rhythmik gegenüber. Es ist daher fragwürdig, ob die jahreszeitlichen *Bmal1*-Schwankungen ebenfalls durch Melatonin generiert werden. Um die jahreszeitlichen Variationen so gering wie möglich zu halten, wurden alle Probandinnen dieser

Studie ausschließlich in den drei Frühjahrs- (März - Juni) und Herbstmonaten (September – November) untersucht. Da der Melatoninrhythmus durch seine Wirkung im SCN den circadianen Rhythmus unterstützt, verringert sich im Alter mit abnehmender Melatoninkonzentration und –rhythmik auch die circadiane Rhythmik (Reiter *et al.* 2014). Dies konnte in dieser Studie aufgrund der höheren Melatoninwerte bei den älteren Frauen nicht bestätigt werden.

MELATONIN UND *hSOD1*-GEN SOWIE SOD1-PROTEIN

Melatonin stimuliert die Synthese antioxidativer Enzyme wie der SOD1 (Antolín *et al.* 1996; Mayo *et al.* 2002). Folglich ist zu erwarten, dass der Melatonin-Peak, dem *hSod1* und dem SOD1-Peak vorangeht. Der abendliche Melatoninanstieg sollte zu einer Stimulation der SOD1-Synthese führen. Die Daten zeigen für beide Altersgruppen einen abendlichen Melatoninanstieg zwischen 20 und 24 Uhr. Damit einhergeht in exakt demselben Zeitraum ein Anstieg der *hSod1*-mRNA sowie ein Anstieg der Proteinkonzentration. Eine sehr signifikant positive Korrelation zeigt, dass eine hohe Melatoninkonzentration um 20 Uhr zu hohen *hSod1*-mRNA-Konzentrationen um 04 Uhr führt. Auch bei getrennter Betrachtung der beiden Altersgruppen bleibt dieser signifikante Zusammenhang bestehen. Ebenfalls zu erwarten waren positive Korrelationen zwischen Melatonin- und SOD1-Proteinkonzentration. Dies konnte in der Gesamtgruppe sowie bei den älteren Probandinnen nicht statistisch abgesichert werden. Bei den Jüngeren hingegen konnten signifikante Zusammenhänge zwischen den nachmittäglichen (16 Uhr) sowie nächtlichen (24 Uhr) Melatoninkonzentrationen mit SOD1-Proteinmengen am Mittag (12 Uhr) sowie in der Nacht (04 Uhr) gezeigt werden. Denkbar wäre, dass die SOD1-aktivierende Wirkung von Melatonin mit zunehmendem Alter abnimmt. Dies würde die bei den Jüngeren beobachteten positiven Korrelationen sowie das Fehlen jeglicher Zusammenhänge bei den Älteren erklären.

Positive Korrelationen zwischen Melatonin und der SOD1-Aktivität wurden auch von Albarrán und Kollegen (2001) beschrieben. In deren Studie mit Hühnern fand sich eine zeitliche Übereinstimmung der Peaks von Melatonin, SOD1-Aktivität und gesamter antioxidativer Kapazität um etwa 24 Uhr nachts. Die Unterdrückung der Melatoninsynthese durch dauerhaftes Licht (24 Stunden Helligkeit) führte bei Hühnern zu deutlich verringerten Melatoninkonzentrationen und stark verringerter SOD1-Aktivität. Daraus lässt sich die Annahme ableiten, dass Individuen mit einer höheren Melatoninsynthese hohe *hSod1*-mRNA-

Konzentrationen aufweisen. Melatonin stimuliert die Expression antioxidativer Enzyme und dauerhafte Melatoningabe führte bei Syrischen Hamstern (Antolín *et al.* 1996) und bei Ratten (Kotler *et al.* 1998) zu gesteigerten RNA-Konzentrationen für die SOD1, die SOD2 und die Glutathionperoxidase.

Studien zeigten, dass bei Abwesenheit des circadianen Melatonin-Rhythmus die circadiane Rhythmik von Expression und Aktivität der SOD1 stark abnehmen lässt (Albarrán *et al.* 2001; Díaz-Muñoz *et al.* 1985; Martín *et al.* 2003). Dies weist darauf hin, dass Melatonin von maßgeblicher Bedeutung für die circadiane Rhythmik der SOD1 ist. Wie dieser Signalweg auf molekularer Ebene innerhalb der Zellen vonstatten geht, ist bislang nicht bekannt (Rodriguez *et al.* 2004).

8.2.4 BEANTWORTUNG DER 2. LEITFRAGE

Die zweite Leitfrage dieser Studie befasst sich mit den Zusammenhängen zwischen den circadianen Merkmalssystemen.

Interessanterweise finden sich teils hoch signifikante positive Zusammenhänge zwischen den Genexpressionen von *hBmal1* und *hSod1* zu den einzelnen Messzeitpunkten. Dies unterstützt eine Annahme, derzufolge das BMAL1-Protein als TF an die regulatorische E-Box im Promotor des *hSod1*-Gens bindet und die Synthese des SOD1-Proteins reguliert. Somit dürfte das *hSod1*-Gen ein CCG sein. Dies unterstützt die Studie von Kondratov *et al.* (2006) und zeigt, dass die an Mäusen beschriebenen Erkenntnisse hinsichtlich der Genregulation auch auf den Menschen übertragbar sein dürften. Die 4-8 stündige Verschiebung zwischen der *hSod1*-mRNA- und der SOD1-Proteinkonzentration unterstützt die von Jang und Kollegen (2011) vorgeschlagene Steuerung der SOD1-Konzentration via transkriptioneller Regulation, obwohl keine positiven Korrelationen zwischen mRNA- und Proteinmenge bestehen. Der OS zeigt einen identischen Kurvenverlauf wie die SOD1-Konzentration, jedoch konnte dieser positive Zusammenhang nicht statistisch durch signifikante Zusammenhänge abgesichert werden. Während die Kurvenverläufe von Melatonin und OS sich gegenläufig verhalten, lassen sich die signifikanten Korrelationen nicht eindeutig einer Richtung zuordnen.

Die Daten zeigen für beide Altersgruppen einen abendlichen Melatoninanstieg zwischen 20 und 24 Uhr. Damit einhergehen in exakt demselben Zeitraum Anstiege der *hBmal1*-mRNA, der *hSod1*-mRNA und der SOD1-Proteinkonzentration. Die Konzentrationpeaks von Melatonin fallen in denselben Zeitraum (24-04 Uhr) wie die Maxima von *hBmal1*- und *hSod1*-mRNA

sowie bei Jüngeren auch der SOD1-Peak. Da Melatonin im SCN die BMAL1-Synthese induziert und BMAL1 seinerseits die *hSod1*-Transkription reguliert, passen diese Ergebnisse hervorragend in das bisher existierende Gesamtbild und lassen vermuten, dass die Erkenntnisse auch für den Menschen zutreffen.

8.3 ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN ALTERNBEDINGTEN UNTERSCHIEDEN UND DEM LEBENSSTIL

Die dritte Leitfrage untersucht, ob altersbedingte Unterschiede in den circadianen Merkmalsystemen mit Parametern, die den Lebensstil betreffen, in Verbindung gebracht werden können. Hierzu werden Zusammenhänge zwischen den Lebensstil betreffenden Variablen und dem Alter diskutiert und diese anschließend mit den circadianen Merkmalen OS, Melatonin und SOD1-Protein sowie *hBmal1*-Gen und *hSod1*-Gen in Verbindung gesetzt.

8.3.1 LEBENSSTIL BETREFFENDE PARAMETER

CHRONOTYP

Der Chronotyp eines Menschen wirkt sich unmittelbar auf die Phasenlage circadianer Rhythmen aus. Deshalb wurde mithilfe des DMEQ-Fragebogens die Morgen- und Abendpräferenz der Probandinnen ermittelt. Ältere Probandinnen zeigten in dieser Studie eine größere Morgenpräferenz als die jüngeren. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen früherer Studien, die mit zunehmendem Alter ein früheres Aufwachen ermittelten (z. B. Miles u. Dement 1980) und zeigten, dass ältere Menschen eine frühere Phasenlage aufweisen sowie höhere Punktwerte im Horne-Östberg-Fragebogen erzielten (Horne u. Östberg 1976; Zepelin u. McDonald 1987; Weitzman *et al.* 1982; Sherman *et al.* 1985). Die frühere Phasenlage der älteren Probandinnen zeigt sich nicht nur im Schlaf-Wach-Rhythmus, sondern in zahlreichen Parametern. In dieser Studie zeigt sich die frühere Phasenlage der älteren Frauen bei der peripheren Hauttemperatur, der mRNA-Expression des *hSod1*-Gens sowie im Melatoninrhythmus. In diesen Variablen liegen die maximal gemessenen Werte der Älteren früher als bei der jüngeren Vergleichsgruppe.

SCHLAFQUALITÄT

Zahlreiche Parameter wie Bewegung und Zeit im Freien sowie tageszeitliche Nickerchen können die Schlafqualität beeinflussen. So kann z. B. körperliche Aktivität zu einer verbesserten Schlafqualität führen (Vuori *et al.* 1988). Dasselbe gilt für den Aufenthalt im Freien, da besonders am Vormittag durch das im Tageslicht enthaltene Blaulicht die Melatoninkonzentration sinkt. Die vormittägliche Hemmung der Melatoninsynthese unterstützt einen ausgeprägten Melatoninrhythmus, der wiederum für eine gute Schlafqualität wichtig ist (Brainard *et al.* 1997). Nickerchen am Tage hingegen können den natürlichen Schlaf-Wach-Rhythmus negativ beeinträchtigen und so zu abendlicher Wachheit sowie einer schlechteren Schlafqualität führen. Die Korrelationsanalysen dieser Studie konnten diese Punkte jedoch nicht durch signifikante Befunde unterstützen. Grund dafür könnte einerseits die kleine Stichprobengröße sein. Andererseits ist zu beachten, dass freiwillige Teilnehmerinnen generell an Gesundheitsthemen interessiert sind und auf ihren Lebensstil achten. Folglich sind in dieser Gruppe weniger Unterschiede zu erwarten als in einer Gruppe mit zufällig ausgewählten Teilnehmern aus der Gesamtbevölkerung.

Die jüngeren Probandinnen zeigen eine positive Korrelation zwischen der Schlafqualität und der an freien Tagen im Freien verbrachten Zeit. Der Befund widerspricht auf den ersten Blick der Erwartung: Die im Freien verbrachte Zeit führt durch das Blaulicht zu einer Hemmung der Melatoninsynthese. Dies fördert tagsüber die natürliche Melatoninrhythmik und sollte zu einer besseren Schlafqualität führen. In dieser Studie zeigt der Zusammenhang jedoch das Gegenteil an: Je mehr Zeit die jungen Probandinnen im Freien verbrachten, umso höher war ihr Punktwert im PSQI und somit schlechter ihre Schlafqualität. Zu beachten ist, dass der PSQI die vergangenen 4 Wochen abbildet, während die Zeit im Freien an freien Tagen sich bei jüngeren Probandinnen überwiegend auf das Wochenende bezieht. Fand zudem der Aufenthalt im Freien eher abends statt, könnte dies durch eine abendliche Hemmung der Melatoninsynthese die Schlafqualität verschlechtern haben.

LEBENSZUFRIEDENHEIT UND STRESS

Die Untersuchung zeigte, dass unmittelbare und hochsignifikante Korrelationen zwischen dem Alter und der Lebenszufriedenheit (positiv) sowie zwischen dem Alter und dem subjektiv empfundenen Stress (negativ) bestehen. Während sich jüngere Menschen auf dem Weg zur Adoleszenz (bis etwa 25 Jahre) in einer Aufbruchstimmung befinden, setzt im Anschluss eine

Phase ein, in der es um den Erhalt des bisher im Leben Erreichten geht. Neben hohen Anforderungen in Beruf, Karriere und Familie, die als stressig empfunden werden, geht es um die Absicherung des gegenwärtigen Lebensstandes. Erst in der zweiten Lebenshälfte (ab etwa 60 Jahren) folgt eine Entspannung und die Menschen werden gelassener. Dadurch nimmt der Stress ab, während die Lebenszufriedenheit im Zuge dieses zur Ruhe Kommens ansteigt. Diese Sachverhalte wurden intensiv untersucht (Generali Deutschland 2017; Kessler u. Bowen 2015). In weiter fortschreitendem Alter kann es durch körperliche Einschränkungen und Erkrankungen oder Einsamkeit zu einer Verringerung der Lebenszufriedenheit kommen. Da in dieser Studie jedoch explizit gesunde Probandinnen rekrutiert wurden, nimmt dieser Effekt keinen Einfluss auf die Ergebnisse.

8.3.2 ZUSAMMENHANG ZWISCHEN *hBMAL1*-GEN, *hSOD1*-GEN UND SOD1-PROTEIN MIT DEM LEBENSSTIL

hBMAL1-GEN – LEBENSSTIL

Die signifikant positiven Korrelationen zwischen der Schlafqualität (PSQI-Punkte) und der Konzentration an *hBmal1*-mRNA legen nahe, dass eine starke Synthese dieses Uhrengens möglicherweise zu einer schlechten Schlafqualität führen könnte. Dies kann sowohl in der Gesamtgruppe als auch in beiden Altersgruppen beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass die möglicherweise schlafstörende Wirkung der Uhrengensexpression altersunabhängig zum Tragen kommen könnte. Ob an dieser Stelle tatsächlich ein kausaler Zusammenhang zwischen der Schlafqualität und der Konzentration an mRNA für das BMAL1-Protein besteht, muss in weiteren Untersuchungen geprüft werden.

Sowohl in der Gesamtgruppe als auch bei den jüngeren Frauen werden signifikant positive Korrelationen zwischen der mittleren *hBmal1*-Konzentration über den Tag und dem empfundenen Stress beobachtet. Jüngere Frauen empfinden mehr Stress als Frauen zwischen 60 und 80 Jahren. Ob das Stressempfinden eine direkte Auswirkung auf Uhrengensexpressionen hat und somit ein kausaler Zusammenhang besteht, bleibt zu erforschen.

Die im Freien verbrachte Zeit zeigt ebenfalls positive Zusammenhänge mit der *hBmal1*-mRNA. Die Zeit im Freien unter natürlichen Lichtbedingungen fördert den Melatoninrhythmus und damit die circadiane Rhythmik mit den beteiligten Uhrengenen wie *hBmal1*.

hSOD1-GEN – LEBENSSTIL

Die Zusammenhänge zwischen der *hSod1*-Konzentration und Lebensstil-Parametern zeigen deutliche Übereinstimmungen mit den im vorherigen Absatz erläuterten Zusammenhängen zwischen *hBmal1* und dem Lebensstil. So finden sich beispielsweise auch zwischen der Schlafqualität und der *hSod1*-Konzentration signifikant positive Zusammenhänge. Die Übereinstimmungen zwischen den beiden Genen lassen sich durch die Korrelationen zwischen ihnen, die in vorherigen Kapiteln beschrieben und diskutiert wurden, erklären. Auch hier bleibt weiterführend zu untersuchen, ob Kausalzusammenhänge vorliegen.

SOD1-PROTEIN

Die signifikant positiven Zusammenhänge zwischen dem SOD1-Protein und Variablen, die den Sport betreffen, zeigen, dass Sport die Konzentration an SOD1-Protein und damit den Schutz vor OS erhöhen kann. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt bei den älteren Frauen. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der Studie von Özbay u. Dülger (2002), in der 257 gesunde Frauen und Männer untersucht wurden, von denen 35 weibliche Individuen zwischen 57-71 Jahre alt waren.

Die bei den jüngeren Frauen beobachtete signifikant negative Korrelation könnte anzeigen, dass subjektiv empfundener Stress die SOD1-Konzentration negativ beeinflusst und somit die Anfälligkeit für OS erhöht. Dies steht in Einklang mit Befunden von Adachi *et al.* (1993), denen zufolge bei Ratten subjektiv empfundener Stress oxidativen Stress auslösen kann.

Ebenfalls scheint sich bei den Jüngeren der Konsum koffeinhaltiger Getränke negativ auf die SOD1-Konzentration auszuwirken. Die bei den jüngeren Frauen beobachteten signifikant negativen Zusammenhänge zwischen dem SOD1-Protein und dem Konsum koffeinhaltiger Getränke legen nahe, dass möglicherweise das Koffein über eine Unterdrückung der Melatoninsynthese auch die Synthese der SOD1 vermindert. Koffein bindet aufgrund seiner großen strukturellen Ähnlichkeit zu Adenosin an die Adenosinrezeptoren, ohne jedoch den Rezeptor-vermittelten Signalweg, der im Normalfall Nervenaktivität senkt und Müdigkeit initiiert, zu aktivieren (Fredholm 1979). Da Adenosin ebenso wie Noradrenalin für die Melatoninsynthese benötigt wird (Klein *et al.* 1970), unterbindet die Blockierung des Adenosinrezeptors durch Koffein die Melatoninsynthese. In der Folge sind niedrigere SOD1-Konzentrationen denkbar, wie sie in dieser Studie bei den jüngeren Frauen beobachtet wurden. Bei den Älteren hingegen zeigt sich der Zusammenhang zwischen SOD1 und

Kaffeekonsum trotz höheren Kaffeekonsums nicht. Erklärungsansätze hierfür sind physiologische Anpassungen an das Koffein im Laufe des Lebens durch beispielsweise eine Erhöhung oder Abnahme der Rezeptorenzahl (Elmenhorst *et al.* 2012; Meyer *et al.* 2007) und die damit verbundene abnehmende Auswirkung auf die Melatoninsynthese. Des Weiteren wirkt Koffein antioxidativ (Shi *et al.* 1991). Die älteren Frauen konsumieren hochsignifikant mehr Koffein als die Jüngeren, sodass die antioxidative Wirkung des Koffeins bei den Älteren möglicherweise zu einer Senkung des OS führt. Dies würde die negativen signifikanten Zusammenhänge zwischen OS-Konzentrationen und Kaffeekonsum bei den Älteren erklären.

8.3.3 ZUSAMMENHANG ZWISCHEN OXIDATIVEM STRESS UND DEM LEBENSSTIL

Die Anzahl an Sportstunden pro Woche sowie der körperliche Aktivitätsgrad zeigen signifikant negative Korrelationen mit der OS-Konzentration um 20 Uhr in der Gesamtgruppe. Dies könnte darauf hindeuten, dass Bewegung und Aktivität den abendlichen OS verringern. Dies steht im Einklang mit Studien (Özbay u. Dülger 2002), die berichten, dass moderate Bewegung und Aktivität den OS senken können. Auch die signifikant negativen Korrelationen zwischen der Sportstundenanzahl pro Woche und dem OS-Wert bei älteren Frauen um 12 sowie um 20 Uhr zeigen dies. Zu anderen Zeitpunkten sowie bei den jüngeren Probandinnen bestanden keine signifikanten Zusammenhänge. Dies weist daraufhin, dass insbesondere in fortgeschrittenem Alter Bewegung den OS-Wert senken könnte. Langfristig sollte der OS durch Sport geringer sein als bei Nichtsportlern, wodurch ein negativer Zusammenhang zwischen OS und körperlicher Aktivität und Sportstunden pro Woche zu erwarten gewesen ist. Özbay u. Dülger (2002) zeigten, dass die OS-reduzierende SOD1-Aktivität im direkten Anschluss an Sportaktivitäten bei untrainierten Probanden verringert war. Dies resultiert in Kombination mit dem Sport-bedingten Anstieg an OS in einer höheren OS-Konzentration direkt nach der sportlichen Aktivität.

Es ist überraschend, dass weder Ernährungsgewohnheiten noch die im Freien verbrachte Zeit die Konzentration an OS nennenswert beeinflussen. Eine gesunde Ernährung sollte zu niedrigeren OS-Werten führen als eine fett- und kohlenhydratreiche Ernährung (Dai *et al.* 2008). Da die in Obst und Gemüse enthaltenen Vitamine C und E als freie Antioxidantien wirken, wurde erwartet, dass eine negative Korrelation zwischen der Menge an verzehrtem Obst und Gemüse und dem OS besteht. Dies ließ sich nicht zeigen. Jedoch findet sich erwartungsgemäß bei den älteren Frauen ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen

dem OS und dem BMI. Ein positiver Zusammenhang zwischen einem hohen BMI und dem OS wurde bereits von Tunc *et al.* (2011) beschrieben. Die jüngeren Frauen zeigten eine deutlich geringere Standardabweichung als die älteren, wodurch bei den jüngeren ein signifikanter Zusammenhang des BMI mit anderen Variablen aufgrund der geringen Streuung der Werte äußerst unwahrscheinlich ist. Alkoholkonsum induziert OS und erhöht darüber die OS-Konzentration (Das u. Vasudevan 2007). Auch für diese Variable war aus den Studienergebnissen kein signifikanter Zusammenhang ersichtlich. Möglicherweise meldeten sich insbesondere Frauen zur Studienteilnahme, die ein erhöhtes Interesse an gesundheitsbezogenen Themen haben und sich im Zuge dessen bereits tendenziell gesund ernähren. In dem Fall sind die Unterschiede und Nuancen eher fein.

Der bei älteren Probandinnen signifikant negative Zusammenhang zwischen der Schlafqualität und dem morgendlichen OS könnte dahingehend interpretiert werden, dass eine schlechte Schlafqualität den OS nicht steigert.

8.3.4 ZUSAMMENHANG ZWISCHEN MELATONIN UND DEM LEBENSSTIL

Auf Basis des aktuellen Standes der Wissenschaft lassen sich verschiedene Annahmen ableiten, die in dieser Studie überprüft wurden. So war anzunehmen, dass sich Zusammenhänge zwischen Melatonin und dem Chronotypen, der Schlafqualität bzw. dem Schlafverhalten am Tag sowie dem Aufenthalt im Freien zeigen könnten. In Bezug auf den Chronotypen wurde diese Erwartung vollständig erfüllt: Die signifikant positive Korrelation der Gesamtgruppe zwischen der Melatoninkonzentration um 20 Uhr und der erreichten Punktzahl beim D-MEQ zeigt, dass erwartungsgemäß die Tendenz zum Morgentypen mit einem früheren abendlichen Melatoninanstieg einhergeht. Bei Normal- und Abendtypen steigt die Melatoninkonzentration erst zu späterer Stunde an. In diesem Zuge ist eine Korrelation zwischen der Melatoninkonzentration und der Uhrzeit der Hauttemperatur-Nachtpeaks denkbar, da beide in engem Verhältnis mit dem Schlafrhythmus stehen. Tatsächlich findet sich für den zweiten Nachtpeak ein signifikant negativer Zusammenhang mit der Melatoninkonzentration um 20 Uhr ($r_s = -0,343$, $p = 0,028$). Die mit dem PSQI ermittelte Schlafqualität ist wie bereits beschrieben bei den Jüngeren besser als bei den Älteren (n.s.), was durch Literaturbefunde bestätigt wird (Buysse *et al.* 1991). Allerdings konnten die Ergebnisse dieser Studie keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen der Melatoninkonzentration und der Schlafqualität liefern. Hier wäre zu erwarten, dass eine hohe

nächtliche Melatoninkonzentration zu einer guten Schlafqualität führt (Haimov *et al.* 1994) und folglich ein negativer Zusammenhang besteht. Allerdings ist für eine gute Schlafqualität nicht nur eine hohe abendliche bzw. nächtliche Melatoninkonzentration, sondern vor allem eine ausgeprägte Melatoninrhythmik wichtig (Haimov *et al.* 1994). Zu beachten ist bei den Ergebnissen dieser Studie, dass Probandinnen mit guter Schlafqualität gesucht wurden, sodass die Diversität bezüglich dieses Merkmals sehr gering ist.

Die Analysen zeigen einen signifikant negativen Zusammenhang zwischen der Melatoninkonzentration um 08 Uhr morgens und der Nickerchendauer am Tag. Eine hohe Melatoninkonzentration am Morgen könnte auf einen gut ausgeprägten Melatoninrhythmus hindeuten, bei dem am Nachmittag wenig Melatonin im Körper vorliegt. Folglich wäre die Schläfrigkeit gering und es wird kein Nickerchen gehalten. Nickerchen und Melatoninkonzentration scheinen sich jedoch nur sehr bedingt zu beeinflussen, da zu keinem anderen Zeitpunkt ein signifikanter Zusammenhang besteht.

Blaulicht, welches beim Aufenthalt im Freien auf den Körper wirkt, hemmt die Synthese des Nachthormons Melatonin. Zwischen dem im Freien verbrachten Zeitraum und der Melatoninkonzentration am Mittag (12 Uhr) wurde bei den älteren Probandinnen überraschend ein positiver Zusammenhang ermittelt. Zu erwarten gewesen wäre ein mittäglicher negativer Zusammenhang: Je mehr Zeit die Probanden im Freien verbringen, umso geringer sollte die Melatoninkonzentration am Mittag sein. Allerdings erfasste der Fragebogen nicht, zu welcher Tageszeit die Zeit im Freien verbracht wurde. Lag die Zeit im Freien erst am Nachmittag, kann das Blaulicht die morgendliche Melatoninsynthese nicht unterbunden haben. In der Gesamtgruppe sowie in der älteren Gruppe besteht ein positiver Zusammenhang zwischen der Melatoninkonzentration um 20 Uhr und der an freien Tagen im Freien verbrachten Zeit. Dies deckt sich mit Studien, die postulieren, dass der Aufenthalt im Freien zu einer Erhöhung der Melatoninkonzentration am Abend führen kann (Obayashi *et al.* 2012). Entscheidend ist, wann die Zeit im Freien verbracht worden ist.

8.3.5 BEANTWORTUNG DER 3. LEITFRAGE

Die dritte Leitfrage umfasst die Zusammenhänge zwischen Variablen, die den Lebensstil betreffen, und den circadianen Merkmalen OS, Melatonin und SOD1-Protein sowie *hBmal1* und *hSod1*-mRNA.

Die älteren Frauen zeigten eine größere Morgenpräferenz (n.s.) als die jüngere Vergleichsgruppe. Damit einhergeht eine frühere Phasenlage, die sich neben dem Schlaf-Wach-Rhythmus auch in der peripheren Hauttemperatur, der mRNA-Expression des *hSod1*-Gens sowie im Melatoninrhythmus abbildet. In diesen Variablen liegen die maximal gemessenen Werte der Älteren früher als bei der jüngeren Vergleichsgruppe. Ältere Probandinnen zeigen eine schlechtere Schlafqualität als die jüngeren Frauen (n.s.). Dies steht jedoch in keinem statistisch signifikanten Zusammenhang mit der Melatoninkonzentration.

Zwischen dem subjektiv empfundenen Stress und dem OS fand sich in keiner Altersgruppe ein signifikanter Zusammenhang. Im Gegensatz dazu weisen die älteren Frauen einen hoch signifikant negativen Zusammenhang zwischen ihrer – im Vergleich zu den jüngeren hohen – Lebenszufriedenheit und dem subjektiv empfundenen Stress auf. Sport steht insbesondere bei den älteren Frauen in einem signifikant negativen Zusammenhang mit der OS-Konzentration. Regelmäßige Bewegung scheint demzufolge besonders in fortgeschrittenem Alter den OS zu senken und somit dem Alternsprozess durch freie Radikale entgegen zu wirken. Dies unterstützen die Befunde der signifikant positiven Korrelationen zwischen Variablen, die den Sport betreffen und der Konzentration des SOD1-Proteins. Die gezeigten Zusammenhänge lassen vermuten, dass Bewegung die Konzentration an SOD1-Protein erhöht, wodurch im Umkehrschluss der OS-Konzentration sinkt. Diese Zusammenhänge treten besonders deutlich bei älteren Frauen hervor, sodass Bewegung im Alter vorbeugend vor Schäden durch OS wirken dürfte.

Die meisten Ernährungsgewohnheiten zeigen in dieser Studie keine signifikanten Zusammenhänge mit dem SOD1-Protein und dem OS. Die bei den jüngeren Frauen beobachteten negativen Zusammenhänge zwischen dem SOD1-Protein und dem Konsum koffeinhaltiger Getränke legen nahe, dass möglicherweise das Koffein die Synthese der SOD1 vermindert. Dies lässt sich damit erklären, dass die Aufnahme von Koffein die Melatoninsynthese verhindert (Burke *et al.* 2015). Melatonin wiederum könnte in der Folge seiner Aufgabe, die SOD1-Synthese zu stimulieren, nur vermindert nachkommen. Bei den Älteren

hingegen besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Kaffeekonsum und der SOD1-Konzentration, was daraufhindeutet, dass dieser Effekt mit dem Alter abnimmt.

8.4 METHODENKRITIK

AUSWAHL DER PROBANDINNEN

Für diese Studie wurden freiwillige Frauen als Probandinnen rekrutiert. Dabei ist anzunehmen, dass sich insbesondere Frauen als Teilnehmerinnen zur Verfügung stellen, die ein hohes Interesse an Gesundheitsthemen haben und daher einen eher als gesund zu bezeichnenden Lebensstil führen. Dies beinhaltet z. B. regelmäßigen Sport, Aktivitäten bzw. das Aufhalten im Freien sowie eine gesunde Ernährung. Folglich sind in der Gesamtgruppe der Probandinnen diesbezüglich geringere Unterschiede zu erwarten als in der Gesamtbevölkerung. Dies sollte bei der Interpretation der Ergebnisse, die mit diesen Variablen in Zusammenhang stehen, berücksichtigt werden. Da Variablen, die den Lebensstil betreffen, vielfach große Variationen zeigen, ist es schwierig, signifikante Unterschiede zu beobachten. Hinzukommt, dass die eher kleine Größe des Probandenkollektivs eine geringere statistische Power innehat, was die Beobachtung von signifikanten Unterschieden seinerseits erschwert.

In Bezug auf die Probandinnen ist zu beachten, dass es sich nicht nur in Bezug auf das Alter um zwei heterogene Gruppen handelt. Ältere Frauen folgen in der Regel einem eher strukturierten und regelmäßigen Tagesablauf – sowohl solange sie noch berufstätig sind (42,9 %) als auch im Ruhestand (57,1 %). Die jüngeren Probandinnen hingegen waren überwiegend Studierende (90,5 %), die durch täglich veränderliche Zeiten an der Universität sowie in Nebenjobs deutlich unregelmäßigere Tagesabläufe haben. Dies könnte sich auch auf die untersuchten Rhythmen und deren Stabilität ausgewirkt haben.

Am Versuchstag mussten die Probandinnen alle zur selben Uhrzeit in der Universität erscheinen, sodass sie zum Teil erheblich früher aufstanden als an regulären Tagen. Dadurch verkürzte sich teilweise die Schlafdauer. Ob dies Auswirkungen auf die untersuchten Parameter haben kann, ist unklar.

ÜBERPRÜFBARKEIT DES PROBANDENVERHALTENS

Die vorliegende Studie wurde teils in der Universität und teils ambulant bei den Probandinnen zuhause durchgeführt. Dies bietet den Vorteil, dass die Probandinnen weitestgehend in ihrem normalen Umfeld und Tagesablauf leben und nicht unter strikten normalisierten Labor-

bedingungen. Dadurch wird der gewöhnliche Alltag der Versuchspersonen besser abgebildet und circadiane Rhythmen werden nicht verschoben oder angeglichen. Andererseits ist während der ambulanten Phase keine genaue Überwachung der Teilnehmer möglich, sodass die Einhaltung der Vorgaben zu Essenszeit, nicht zu konsumierenden Nahrungsmitteln, das Unterlassen von Nickerchen sowie das korrekte Tragen der Blaulichtblockerbrille nicht über den gesamten Zeitraum kontrolliert werden konnten. Auch zwei der sechs Probennahmen erfolgten nachts selbstständig und entzogen sich infolgedessen der Kontrolle durch die Autorin. Der Vorteil der eigenständigen Sammlung in gewohnter Umgebung besteht jedoch im Erhalt der Normalität für die Probandinnen gegenüber einer Nacht im Schlaflabor.

AUSWAHL DER MESSZEITPUNKTE

Bei allen circadianen Rhythmen, die in dieser Studie untersucht wurden, ist zu beachten, dass über 24 Stunden in regelmäßigen 4-stündigen Abständen insgesamt 6 Messzeitpunkte lagen. Dies bedeutet, dass die Peaks der circadianen Rhythmen nicht direkt erfasst wurden, wenn sie zwischen zwei Messzeitpunkten lagen. Der Zeitpunkt mit dem höchsten ermittelten Messwert ist folglich nicht zugleich zwangsläufig der Zeitpunkt des Peaks einer circadianen Rhythmik und der höchste Messwert damit nicht der höchste auftretende Wert insgesamt.

RNA-ANALYTIK

Obwohl die RNA-Analytik in allen Punkten – Probensammlung, -lagerung, RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und qRT-PCR – sorgfältig getestet und optimiert wurde, zeigten sich in den anschließenden Analysen der Probandenproben viele Datenausfälle. Diese gehen vermutlich zurück auf unzureichende mRNA-Mengen in den Proben nach der mRNA-Isolierung. Dem könnte in folgenden Studien begegnet werden, indem Zellen für die RNA-Analytik von der Mundschleimhaut beider Wangenseiten gesammelt werden, um so die mRNA-Ausbeute zu erhöhen. Die beidseitige Sammlung für mRNA schließt jedoch eine zusätzliche Probensammlung für Proteinanalytik aus. Wird sowohl Material für RNA- als auch Proteinanalysen benötigt, müsste eine Methode etabliert werden, mit der aus einer Probe sowohl RNA als auch Proteine isoliert werden können.

PROTEINANALYTIK

Die für diese Studie in der AG Humanbiologie neu etablierte Methode des Western Blots mit anschließender densitometrischer Bestimmung lieferte hervorragende Ergebnisse für alle Probandinnen und zu allen Zeitpunkten. Die untersuchten Proteine SOD1 und β -Aktin lieferten

sehr verlässliche und über die Blots hinweg vergleichbare Daten. Die deutlich sichtbare circadiane Rhythmik des SOD1-Proteins bei den einzelnen Probandinnen sowie in der Gesamtgruppe zeigt eine hohe Qualität und Verlässlichkeit der Werte. Das BMAL1-Protein hingegen kann mit der hier verwendeten Methode aus humanen MSH nicht nachgewiesen werden, weil keine klaren Banden erkennbar waren. Die oben genannten Proteine waren problemlos in den humanen MSH nachweisbar und das BMAL1-Protein konnte seinerseits mit derselben Methode in Zellkulturextrakten aus Schweineaugen (Retinazellen) erfolgreich quantifiziert werden. Daher kann ein Fehler in der Labormethodik und den verwendeten Reagenzien ausgeschlossen werden. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass humane MSH eine zu geringe BMAL1-Proteinkonzentration enthalten, um BMAL1 mit der verwendeten Methode detektieren und quantifizieren zu können. Hier würde die Anwendung einer sensitiveren Methode möglicherweise zum Erfolg führen.

MELATONINANALYTIK

Es traten überraschend höhere Melatoninwerte bei den älteren Probandinnen im Vergleich zu den jüngeren auf. Dies könnte zu der nächtlichen Sammlungszeit um 04 Uhr die Folge einer höheren Sensibilität der Jüngeren gegenüber Licht sein. Das für die Sammlung eingeschaltete Licht, könnte die Melatoninsynthese der Jüngeren gehemmt haben, wohingegen es bei den Älteren aufgrund einer altersbedingten verringerten Lichtsensibilität zu keinen Veränderungen kam. In Folgestudien sollte festgelegt werden, dass die nächtliche Sammlung von Melatonin bei nicht mehr als 10-30 Lux erfolgen darf. Darüber hinaus wirken sich Positionsänderungen auf die Melatoninsynthese aus: Während es keinen nachweisbaren Unterschied im abendlichen Melatoninanstieg gibt, wenn die Probanden liegen, lehnen oder sitzen, führt eine stehende Position zu einem Melatoninanstieg im Blutplasma (Cajochen *et al.* 2003; Deacon u. Arendt 1994). Diese ist jedoch nach 10 Minuten reversibel. Demzufolge sollte in zukünftigen Untersuchungen vor jeder Speichelsammlung für die Melatoninanalytik eine mindestens 10-minütige Sitzphase eingehalten werden.

OXIDATIVER STRESS-ANALYTIK

Um den oxidativen Stress der Probandinnen quantifizieren zu können, wurde ein ELISA laborintern etabliert. Dieser erfasst oxidative Schäden an DNA und RNA, sodass verschiedene Formen der Schädigungen detektiert wurden, was eine hohe Genauigkeit der gewonnenen Daten ermöglicht. Die circadiane Rhythmik der OS-Konzentration wurde sowohl bei den

einzelnen Probandinnen als auch in den beiden Altersgruppen sehr deutlich. Somit kann die Methode als zuverlässig und aussagekräftig bezeichnet werden. Eine Einschränkung ergab sich durch den Versuchsablauf und die Probenlagerung: Da die OS-Proben laut Hersteller des ELISA-Kits sofort nach der Sammlung bei -80°C gelagert werden müssen, konnten in der Nacht bei der Probensammlung zu Hause keine Proben für die Messzeitpunkte 24 Uhr und 04 Uhr gesammelt werden. Die Ergebnisse der OS-Analysen zeigen einen ausgeprägten Tagesverlauf, sodass die zusätzliche Analyse nächtlicher Proben ein vollständiges und aufschlussreiches Bild über den circadianen Rhythmus der OS-Konzentration liefern würde.

8.5 AUSBLICK

Für die Fortführung und Erweiterung der hier durchgeführten Untersuchungen, wäre es äußerst interessant, beide Geschlechter zu untersuchen, da bei vielen Variablen geschlechtsspezifische Unterschiede eine Rolle spielen. Um diese mit zu erfassen und Unterschiede zwischen Frauen und Männern detektieren zu können, sollten auch Männer untersucht werden. Um die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen, wäre es zudem sinnvoll, die Anzahl der Probanden zu erhöhen.

Die älteren Probandinnen wiesen in vielen die circadiane Rhythmik betreffenden Merkmalen wie der *hBmal1*-, *hSod1*-, *SOD1*- sowie Melatoninrhythmik überraschend höhere Peaks auf als die jüngeren. Dies könnte in Zusammenhang mit den Tagesabläufen stehen: Die jüngeren Probandinnen waren überwiegend Studierende, die durch stark variierende Studienzeiten sowie flexible Nebenjobs vermutlich weniger strukturierte und regelmäßige Tagesabläufe haben als die Älteren, die im Arbeitsleben stehen oder bereits im Ruhestand sind. Um die Altersgruppen in dieser Hinsicht homogener zu gestalten, wäre es ratsam, in folgenden Untersuchungen für die jüngere Gruppe keine Studierenden auszuwählen, sondern bereits im Arbeitsleben stehende Personen. Dies würde zwar die Rekrutierung erschweren, andererseits jedoch geregeltere Tagesabläufe bei den jüngeren bedeuten, als dies bei Studierenden der Fall sein dürfte. Um zu gewährleisten, dass bei den Berufstätigen kein Schlafmangel vorliegt, sind die in dieser Studie verwendeten Prätest-Bedingungen beizubehalten, nach denen die Probandinnen täglich 6-9 Stunden schlafen sollten.

In dieser Studie wurde die Veränderung von OS im Tagesverlauf bei Menschen untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine klare Abnahme über den Tag einhergehend mit einer Abnahme des *SOD1*-Proteins. Es wäre äußerst interessant, zu untersuchen, wie sich die OS-Werte in der

Nacht verhalten, um zu ergründen, wann diese zum Morgen hin wieder ansteigen und ob der Verlauf auch in der Nacht parallel zu dem des SOD1-Proteins liegt.

Die Zusammenhänge zwischen den mRNA-Expressionen der Gene *hBmal1* und *hSod1* waren sehr signifikant, sodass ein kausaler Zusammenhang möglich ist. Um diesen weitergehend zu analysieren, könnten in Tierexperimenten *Bmal1 knock out* Mutanten generiert werden, an denen dann die *hSod1*-Expression untersucht wird. Verändert sich diese im Vergleich zum Wildtyp, kann von einem eindeutigen kausalen Zusammenhang mit *hBmal1* ausgegangen werden. Sollte sich ein solcher Zusammenhang bestätigen, wäre eine Ausweitung des hier beschriebenen Versuchs auf beide Geschlechter und größere Probandenkollektive sinnvoll.

Grauer Star ist als degenerative Augenerkrankung ein Marker für den Alternsprozess und wurde deshalb mit erfasst. Allerdings ließ sich kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Erkrankung und der *hBmal1*-mRNA-Konzentration feststellen. Ob ein Zusammenhang zwischen dem grauen Star und *Bmal1* besteht, könnte am besten im Tiermodell mittels einer *Bmal1 knock out* Mutante nachgewiesen werden.

Bislang ungeklärt ist, weshalb der Peak der SOD1 nachts liegt. Bei Mäusen wurde dieselbe Rhythmik nachgewiesen und der nächtliche Peak mit durch Futteraufnahme und Bewegung gesteigerte ROS-Konzentrationen begründet (Jang *et al.* 2011). Demzufolge müsste der Peak bei tagaktiven Organismen jedoch am Tag liegen. Vergleichbar ist diese Konstellation mit der Melatoninsynthese, die sowohl bei Nacht- als auch bei Tagaktiven zur Nacht hin einsetzt und einen nächtlichen Peak aufweist. Die Rhythmik ist somit über die Evolution in Bezug auf die Tageszeit unverändert, doch die Auswirkungen via Signalwege führen zu unterschiedlichen Ergebnissen: Während die abendliche Melatoninsynthese bei Mäusen für den Beginn der aktiven Phase steht, liegt sie beim Menschen am Beginn der Ruhephase. In weiteren Untersuchungen wäre zu klären, welche Unterschiede sich bei Tag- und Nachtaktiven in Bezug auf den Sinn des nächtlichen SOD1-Peaks herausgebildet haben. Da viele Studien die SOD1-Aktivität untersuchen, wäre es zudem sinnvoll, die Enzymaktivität in folgenden Untersuchungen zu integrieren.

9 LITERATURVERZEICHNIS

- Abizaid, A.; Mezei, G. u. Horvath, T. L. (2004): Estradiol enhances light-induced expression of transcription factors in the SCN. *Brain Research* 1010 (1-2): 35–44.
- Adachi, S.; Kawamura, K. u. Takemoto, K. (1993): Oxidative damage of nuclear DNA in liver of rats exposed to psychological stress. *Cancer Research* 53 (18): 4153–4155.
- Albarrán, M. T.; López-Burillo, S.; Pablos, M. I.; Reiter, R. J. u. Agapito, M. T. (2001): Endogenous rhythms of melatonin, total antioxidant status and superoxide dismutase activity in several tissues of chick and their inhibition by light. *Journal of Pineal Research* 30 (4): 227–233.
- Aldhous, M.; Franey, C.; Wright, J. u. Arendt, J. (1985): Plasma concentrations of melatonin in man following oral absorption of different preparations. *British Journal of Clinical Pharmacology* 19 (4): 517–521.
- Andersen, H. R.; Nielsen, J. B.; Nielsen, F. u. Grandjean, P. (1997): Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clinical Chemistry* 43 (4): 562–568.
- Ando, H.; Ushijima, K.; Kumazaki, M.; Takamura, T.; Yokota, N.; Saito, T.; Irie, S.; Kaneko, S. u. Fujimura, A. (2010): Influence of age on clock gene expression in peripheral blood cells of healthy women. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 65 (1): 9–13.
- Antolín, I.; Rodríguez, C.; Saínz, R. M.; Mayo, J. C.; Uría, H.; Kotler, M. L.; Rodríguez-Colunga, M. J.; Tolivia, D. u. Menendez-Pelaez, A. (1996): Neurohormone melatonin prevents cell damage. Effect on gene expression for antioxidant enzymes. *The FASEB Journal* 10 (8): 882–890.
- Arai, K.; Maguchi, S.; Fujii, S.; Ishibashi, H.; Oikawa, K. u. Taniguchi, N. (1987): Glycation and inactivation of human Cu-Zn-superoxide dismutase. Identification of the in vitro glycated sites. *The Journal of Biological Chemistry* 262 (35): 16969–16972.
- Archer, S. N.; Viola, A. U.; Kyriakopoulou, V.; Schantz, M. von u. Dijk, D.-J. (2008): Inter-individual differences in habitual sleep timing and entrained phase of endogenous circadian rhythms of BMAL1, PER2 and PER3 mRNA in human leukocytes. *Sleep* 31 (5): 608–617.
- Arendt, J. (1988): Melatonin. *Clinical Endocrinology* 29 (2): 205–229.
- Aschoff, J. (1955): Der Tagesgang der Körpertemperatur beim Menschen. *Klinische Wochenschrift* 33 (23-24): 545–551.
- Aschoff, J. (1965): Circadian rhythms in man. *Science (New York, N.Y.)* 148 (3676): 1427–1432.
- Aschoff, J.; Gerecke, U. u. Wever, R. (1967): Phasenbeziehungen zwischen den circadianen Perioden der Aktivität und der Kerntemperatur beim Menschen. *Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* 295 (2): 173–183.
- Atsumi, T.; Iwakura, I.; Kashiwagi, Y.; Fujisawa, S. u. Ueha, T. (1999): Free radical scavenging activity in the nonenzymatic fraction of human saliva. A simple DPPH assay showing the effect of physical exercise. *Antioxidants & Redox Signaling* 1 (4): 537–546.

- Baehr, E. K.; Revelle, W. u. Eastman, C. I. (2000): Individual differences in the phase and amplitude of the human circadian temperature rhythm. With an emphasis on morningness–eveningness. *Journal of Sleep Research* 9 (2): 117–127.
- Balaban, R. S.; Nemoto, S. u. Finkel, T. (2005): Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120 (4): 483–495.
- Balsalobre, A.; Damiola, F. u. Schibler, U. (1998): A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93 (6): 929–937.
- Baňasová, L.; Kamodyová, N.; Janšáková, K.; Tóthová, Ľ.; Stanko, P.; Turňa, J. u. Celec, P. (2015): Salivary DNA and markers of oxidative stress in patients with chronic periodontitis. *Clinical Oral Investigations* 19 (2): 201–207.
- Banks, G.; Heise, I.; Starbuck, B.; Osborne, T.; Wisby, L.; Potter, P.; Jackson, I. J.; Foster, R. G.; Peirson, S. N. u. Nolan, P. M. (2015): Genetic background influences age-related decline in visual and nonvisual retinal responses, circadian rhythms, and sleep. *Neurobiology of Aging* 36 (1): 380–393.
- Barrett, P. u. Bolborea, M. (2012): Molecular pathways involved in seasonal body weight and reproductive responses governed by melatonin. *Journal of Pineal Research* 52 (4): 376–388.
- Bellingham, J. u. Foster, R. G. (2002): Opsins and mammalian photoentrainment. *Cell and Tissue Research* 309 (1): 57–71.
- Benloucif, S.; Burgess, H. J.; Klerman, E. B.; Lewy, A. J.; Middleton, B.; Murphy, P. J.; Parry, B. L. u. Revell, V. L. (2008): Measuring melatonin in humans. *Journal of Clinical Sleep Medicine* 4 (1): 66–69.
- Benloucif, S.; Guico, M. J.; Reid, K. J.; Wolfe, L. F.; L'hermite-Balériaux, M. u. Zee, P. C. (2005): Stability of melatonin and temperature as circadian phase markers and their relation to sleep times in humans. *Journal of Biological Rhythms* 20 (2): 178–188.
- Benot, S.; Molinero, P.; Soutto, M.; Goberna, R. u. Guerrero, J. M. (1998): Circadian variations in the rat serum total antioxidant status. Correlation with melatonin levels. *Journal of Pineal Research* 25 (1): 1–4.
- Berlett, B. S. u. Stadtman, E. R. (1997): Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (33): 20313–20316.
- Berra, B. u. Rizzo, A. M. (2009): Melatonin: circadian rhythm regulator, chronobiotic, antioxidant and beyond. *Clinics in Dermatology* 27 (2): 202–209.
- Berson, D. M.; Dunn, F. A. u. Takao, M. (2002): Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science (New York, N.Y.)* 295 (5557): 1070–1073.
- Beynon, A. L.; Thome, J. u. Coogan, A. N. (2009): Age and time of day influences on the expression of transforming growth factor-beta and phosphorylated SMAD3 in the mouse suprachiasmatic and paraventricular nuclei. *Neuroimmunomodulation* 16 (6): 392–399.
- Bibi, G.; Green, Y. u. Nagler, R. M. (2008): Compositional and oxidative analysis in the saliva and serum of predialysis chronic kidney disease patients and end-stage renal failure patients on peritoneal dialysis. *Therapeutic Apheresis and Dialysis* 12 (2): 164–170.
- Birben, E.; Sahiner, U. M.; Sackesen, C.; Erzurum, S. u. Kalayci, O. (2012): Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization Journal* 5 (1): 9–19.

- Bjarnason, G. A.; Jordan, R. C.; Wood, P. A.; Li, Q.; Lincoln, D. W.; Sothorn, R. B.; Hrushesky, W. J. u. Ben-David, Y. (2001): Circadian expression of clock genes in human oral mucosa and skin: association with specific cell-cycle phases. *The American Journal of Pathology* 158 (5): 1793–1801.
- Blander, G.; Oliveira, R. M. de; Conboy, C. M.; Haigis, M. u. Guarente, L. (2003): Superoxide dismutase 1 knock-down induces senescence in human fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (40): 38966–38969.
- Bligh, J. u. Johnson, K. G. (1973): Glossary of terms for thermal physiology. *Journal of Applied Physiology* 35 (6): 941–961.
- Bloch, G.; Herzog, E. D.; Levine, J. D. u. Schwartz, W. J. (2013): Socially synchronized circadian oscillators. *Proceedings. Biological sciences* 280 (1765): 20130035.
- Bolzán, A. D.; Bianchi, M. S. u. Bianchi, N. O. (1997): Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in human blood. Influence of sex, age and cigarette smoking. *Clinical Biochemistry* 30 (6): 449–454.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1-2): 248–254.
- Brainard, G. C.; Hanifin, J. P.; Greeson, J. M.; Byrne, B.; Glickman, G.; Gerner, E. u. Rollag, M. D. (2001): Action spectrum for melatonin regulation in humans. Evidence for a Novel Circadian Photoreceptor. *The Journal of Neuroscience* 21 (16): 6405–6412.
- Brainard, G. C.; Rollag, M. D. u. Hanifin, J. P. (1997): Photic regulation of melatonin in humans. Ocular and neural signal transduction. *Journal of Biological Rhythms* 12 (6): 537–546.
- Brandes, N.; Schmitt, S. u. Jakob, U. (2009): Thiol-based redox switches in eukaryotic proteins. *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (5): 997–1014.
- Brinker, M. (2002): Untersuchungen zur circadianen Rhythmik in Gymnospermen. Göttingen: Cuvillier, S. 3-7.
- Broadway, J.; Arendt, J. u. Folkard, S. (1987): Bright light phase shifts the human melatonin rhythm during the Antarctic winter. *Neuroscience Letters* 79 (1-2): 185–189.
- Brzezinski, A. (1997): Melatonin in humans. *New England Journal of Medicine* 336 (3): 186–195.
- Bünning, E. (1977): Die physiologische Uhr. Circadiane Rhythmik und Biochronometrie. Heidelberg: Springer-Verlag, S. 2-10.
- Burioka, N.; Fukuoka, Y.; Takata, M.; Endo, M.; Miyata, M.; Chikumi, H.; Tomita, K.; Kodani, M.; Touge, H.; Takeda, K.; Sumikawa, T.; Yamaguchi, K.; Ueda, Y.; Nakazaki, H.; Suyama, H.; Yamasaki, A.; Sano, H.; Igishi, T. u. Shimizu, E. (2007): Circadian rhythms in the CNS and peripheral clock disorders. *Function of Clock Genes: Influence of Medication for Bronchial Asthma on Circadian Gene.* *Journal of Pharmacological Sciences* 103 (2): 144–149.
- Burke, A. u. FitzGerald, G. A. (2003): Oxidative stress and smoking-induced vascular injury. *Progress in Cardiovascular Diseases* 46 (1): 79–90.
- Burke, T. M.; Markwald, R. R.; McHill, A. W.; Chinoy, E. D.; Snider, J. A.; Bessman, S. C.; Jung, C. M.; O'Neill, J. S. u. Wright, K. P. (2015): Effects of caffeine on the human circadian clock in vivo and in vitro. *Science Translational Medicine* 7 (305): 305ra146.

- Buyse, D. J.; Reynolds, C. F.; Monk, T. H.; Hoch, C. C.; Yeager, A. L. u. Kupfer, D. J. (1991): Quantification of subjective sleep quality in healthy elderly men and women using the Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI). *Sleep* 14 (4): 331–338.
- Buyse, D. J.; Reynolds III, C. F.; Monk, T. H.; Berman, S. R. u. Kupfer, D. J. (1989): The Pittsburgh Sleep Quality Index. A new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Research* 28 (2): 193–213.
- Cajochen, C.; Jewett, M. E. u. Dijk, D.-J. (2003): Human circadian melatonin rhythm phase delay during a fixed sleep-wake schedule interspersed with nights of sleep deprivation. *Journal of Pineal Research* 35 (3): 149–157.
- Carneiro, B. T. S. u. Araujo, J. F. (2012): Food entrainment: major and recent findings. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 6: 1–6.
- Carney, J. M.; Starke-Reed, P. E.; Oliver, C. N.; Landum, R. W.; Cheng, M. S.; Wu, J. F. u. Floyd, R. A. (1991): Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl-alpha-phenylnitron. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (9): 3633–3636.
- Carrillo-Vico, A.; Guerrero, J. M.; Lardone, P. J. u. Reiter, R. J. (2005): A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 27 (2): 189–200.
- Chakravarti, B. u. Chakravarti, D. N. (2007): Oxidative modification of proteins: age-related changes. *Gerontology* 53 (3): 128–139.
- Chang, A.-M.; Aeschbach, D.; Duffy, J. F. u. Czeisler, C. A. (2015): Evening use of light-emitting eReaders negatively affects sleep, circadian timing, and next-morning alertness. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (4): 1232–1237.
- Chapple, I. L.C.; Mason, G. I.; Garner, I.; Matthews, J. B.; Thorpe, G. H.; Maxwell, S. R.J. u. Whitehead, T. P. (1997): Enhanced chemiluminescent assay for measuring the total antioxidant capacity of serum, saliva and crevicular fluid. *Annals of Clinical Biochemistry* 34 (4): 412–421.
- Cheeseman, K. H. u. Slater, T. F. (1993): An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin* 49 (3): 481–493.
- Cohen, J. (1992): A power primer. *Psychological Bulletin* 112 (1): 155.
- Cohen, S.; Kamarck, T. u. Mermelstein, R. (1983): A global measure of perceived stress. *Journal of Health and Social Behavior* 24 (4): 385–396.
- Collins, B. u. Blau, J. (2006): Keeping time without a clock. *Neuron* 50 (3): 348–350.
- Collins, K. J.; Exton-Smith, A. N. u. Doré, C. (1981): Urban hypothermia: preferred temperature and thermal perception in old age. *British Medical Journal* 282 (6259): 175–177.
- Colwell, C. S. (2011): Linking neural activity and molecular oscillations in the SCN. *Nature reviews. Neuroscience* 12 (10): 553–569.
- Compton, S. J. u. Jones, C. G. (1985): Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry* 151 (2): 369–374.
- Cooper, C. E.; Vollaard, N. B. J.; Choueiri, T. u. Wilson, M. T. (2002): Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochemical Society* 30 (2): 280–285.
- Cristiano, F.; Haan, J. B. de; Iannello, R. C. u. Kola, I. (1995): Changes in the levels of enzymes which modulate the antioxidant balance occur during aging and correlate with cellular damage. *Mechanisms of Ageing and Development* 80 (2): 93–105.

- Culotta, V. C.; Yang, M. u. O'Halloran, T. V. (2006): Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763 (7): 747–758.
- Cutando, A.; Aneiros-Fernández, J.; López-Valverde, A.; Arias-Santiago, S.; Aneiros-Cachaza, J. u. Reiter, R. J. (2011): A new perspective in Oral health. Potential importance and actions of melatonin receptors MT1, MT2, MT3, and RZR/ROR in the oral cavity. *Archives of Oral Biology* 56 (10): 944–950.
- Dai, J.; Jones, D. P.; Goldberg, J.; Ziegler, T. R.; Bostick, R. M.; Wilson, P. W.; Manatunga, A. K.; Shallenberger, L.; Jones, L. u. Vaccarino, V. (2008): Association between adherence to the Mediterranean diet and oxidative stress. *The American Journal of Clinical Nutrition* 88 (5): 1364–1370.
- Dalle-Donne, I.; Rossi, R.; Giustarini, D.; Milzani, A. u. Colombo, R. (2003): Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 329 (1-2): 23–38.
- Damirchi, A.; Saati Zareei, A. u. Sariri, R. (2015): Salivary antioxidants of male athletes after aerobic exercise and garlic supplementation on: A randomized, double blind, placebo-controlled study. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* 5 (3): 146–152.
- Dardente, H. (2008): Redondance génétique et synchronisation cellulaire dans les horloges circadiennes. *Medecine Sciences: M/S* 24 (3): 270–276.
- Dardente, H.; Menet, J. S.; Poirel, V.-J.; Streicher, D.; Gauer, F.; Vivien-Roels, B.; Klosen, P.; Pevet, P. u. Masson-Pevet, M. (2003): Melatonin induces Cry1 expression in the pars tuberalis of the rat. *Molecular Brain Research* 114 (2): 101–106.
- Das, S. K. u. Vasudevan, D. M. (2007): Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sciences* 81 (3): 177–187.
- Davidson, A. J.; Yamazaki, S.; Arble, D. M.; Menaker, M. u. Block, G. D. (2008): Resetting of central and peripheral circadian oscillators in aged rats. *Neurobiology of Aging* 29 (3): 471–477.
- Davies, K. J. A. /Hrsg. (1995): Oxidative stress. The paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposia* 61: 1-31.
- Deacon, S. u. Arendt, J. (1994): Posture influences melatonin concentrations in plasma and saliva in humans. *Neuroscience Letters* 167 (1-2): 191–194.
- Deminice, R.; Sicchieri, T.; Payão, P. O. u. Jordão, A. A. (2010): Blood and salivary oxidative stress biomarkers following an acute session of resistance exercise in humans. *International Journal of Sports Medicine* 31 (9): 599–603.
- Díaz-Muñoz, M.; Hernández-Muñoz, R.; Suárez, J. u. Chagoya de Sánchez, V. (1985): Day-night cycle of lipid peroxidation in rat cerebral cortex and their relationship to the glutathione cycle and superoxide dismutase activity. *Neuroscience* 16 (4): 859–863.
- Dijk, D. J.; Duffy, J. F.; Riel, E.; Shanahan, T. L. u. Czeisler, C. A. (1999): Ageing and the circadian and homeostatic regulation of human sleep during forced desynchrony of rest, melatonin and temperature rhythms. *The Journal of Physiology* 516 (Pt 2): 611–627.
- Dittmar, M.; Knuth, M.; Beineke, M. u. Epe, B. (2008): Role of oxidative DNA damage and antioxidative enzymatic defence systems in human aging. *Open Anthropological Journal* 1 (1): 38–45.

- Dopico, X. C.; Evangelou, M.; Ferreira, R. C.; Guo, H.; Pekalski, M. L.; Smyth, D. J.; Cooper, N.; Burren, O. S.; Fulford, A. J.; Hennig, B. J.; Prentice, A. M.; Ziegler, A.-G.; Bonifacio, E.; Wallace, C. u. Todd, J. A. (2015): Widespread seasonal gene expression reveals annual differences in human immunity and physiology. *Nature Communications* 6: 7000.
- Drijfhout, W. J.; van der Linde, A. G.; Kooij, S. E.; Grol, C. J. u. Westerink, B. H. (1996): Norepinephrine release in the rat pineal gland: the input from the biological clock measured by in vivo microdialysis. *Journal of Neurochemistry* 66 (2): 748–755.
- Dubbels, R.; Reiter, R. J.; Klenke, E.; Goebel, A.; Schnakenberg, E.; Ehlers, C.; Schiwara, H. W. u. Schloot, W. (1995): Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pineal Research* 18 (1): 28–31.
- Duffy, J. F.; Dijk, D.-J.; Klerman, E. B. u. Czeisler, C. A. (1998): Later endogenous circadian temperature nadir relative to an earlier wake time in older people. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 275 (5): R1478-R1487.
- Dunlap, J. C. (1993): Genetic analysis of circadian clocks. *Annual Review of Physiology* 55 (1): 683–728.
- Dunlap, J. C.; Loros, J. J. u. DeCoursey, P. J. (2004): *Chronobiology. Biological time-keeping*. Sunderland: Sinauer Associates, 393 S.
- Duracková, Z. (2010): Some current insights into oxidative stress. *Physiological Research* 59 (4): 459–469.
- Ebisawa, T.; Karne, S.; Lerner, M. R. u. Reppert, S. M. (1994): Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (13): 6133–6137.
- Ekman, A. C.; Leppäluoto, J.; Huttunen, P.; Aranko, K. u. Vakkuri, O. (1993): Ethanol inhibits melatonin secretion in healthy volunteers in a dose-dependent randomized double blind cross-over study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 77 (3): 780–783.
- Elmenhorst, D.; Meyer, P. T.; Matusch, A.; Winz, O. H. u. Bauer, A. (2012): Caffeine occupancy of human cerebral A1 adenosine receptors. In vivo quantification with ¹⁸F-CPFPX and PET. *Journal of Nuclear Medicine* 53 (11): 1723–1729.
- Evans, M. D.; Dizdaroglu, M. u. Cooke, M. S. (2004): Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research* 567 (1): 1–61.
- Fabrizio, P.; Liou, L.-L.; Moy, V. N.; Diaspro, A.; Valentine, J. S.; Gralla, E. B. u. Longo, V. D. (2003): SOD2 functions downstream of Sch9 to extend longevity in yeast. *Genetics* 163 (1): 35–46.
- Fanjul-Moles, M. L. (2013): ROS signaling pathways and biological rhythms. Perspectives in crustaceans. *Frontiers in Bioscience (Landmark Ed)* 18: 665–675.
- Fanjul-Moles, M. L. u. López-Riquelme, G. O. (2016): Relationship between oxidative stress, circadian rhythms, and AMD. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016: 7420637.
- Farout, L. u. Friguet, B. (2006): Proteasome function in aging and oxidative stress. Implications in protein maintenance failure. *Antioxidants & Redox Signaling* 8 (1-2): 205–216.

- Fava, M.; McCall, W. V.; Krystal, A.; Wessel, T.; Rubens, R.; Caron, J.; Amato, D. u. Roth, T. (2006): Eszopiclone co-administered with fluoxetine in patients with insomnia coexisting with major depressive disorder. *Biological Psychiatry* 59 (11): 1052–1060.
- Fazekas de St Groth, S.; Webster, R. G. u. Datyner, A. (1963): Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochimica et Biophysica Acta* 71: 377–391.
- Finaud, J.; Lac, G. u. Filaire, E. (2006): Oxidative stress. Relationship with exercise and training. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)* 36 (4): 327–358.
- Foret, J.; Benoit, O. u. Royant-Parola, S. (1982): Sleep schedules and peak times of oral temperature and alertness in morning and evening 'types'. *Ergonomics* 25 (9): 821–827.
- Fourtillan, J. B.; Brisson, A. M.; Fourtillan, M.; Ingrand, I.; Decourt, J. P. u. Girault, J. (2001): Melatonin secretion occurs at a constant rate in both young and older men and women. *American journal of physiology. Endocrinology and Metabolism* 280 (1): E11–22.
- Fredholm, B. B. (1979): Are methylxanthine effects due to antagonism of endogenous adenosine? *Trends in Pharmacological Sciences* 1 (1): 129–132.
- Friedman, S. M.; Mulhausen, P.; Cleveland, M. L.; Coll, P. P.; Daniel, K. M.; Hayward, A. D.; Shah, K.; Skudlarska, B. u. White, H. K. (2019): Healthy aging. American geriatrics society white paper executive summary. *Journal of the American Geriatrics Society* 67 (1): 17–20.
- Friguet, B. (2002): Protein repair and degradation during aging. *The Scientific World Journal* 2: 248–254.
- Galano, A.; Tan, D. X. u. Reiter, R. J. (2011): Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *Journal of Pineal Research* 51 (1): 1–16.
- Gall, C. von; Garabette, M. L.; Kell, C. A.; Frenzel, S.; Dehghani, F.; Schumm-Draeger, P.-M.; Weaver, D. R.; Korf, H.-W.; Hastings, M. H. u. Stehle, J. H. (2002a): Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. *Nature Neuroscience* 5 (3): 234.
- Gall, C. von; Stehle, J. H. u. Weaver, D. R. (2002b): Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell and Tissue Research* 309 (1): 151–162.
- Gall, C. von; Weaver, D. R.; Moek, J.; Jilg, A.; Stehle, J. H. u. Korf, H.-W. (2005): Melatonin plays a crucial role in the regulation of rhythmic clock gene expression in the mouse pars tuberalis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1040: 508–511.
- Generali Deutschland, A. G. (2017): *Generali Altersstudie 2017. Wie ältere Menschen in Deutschland denken und leben.* Heidelberg: Springer. 374 S.
- Golden, T. R.; Hinerfeld, D. A. u. Melov, S. (2002): Oxidative stress and aging. Beyond correlation. *Aging Cell* 1 (2): 117–123.
- Gomez-Cabrera, M.-C.; Domenech, E. u. Viña, J. (2008): Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radical Biology & Medicine* 44 (2): 126–131.
- Goncharova, N. D.; Shmaliy, A. V.; Bogatyrenko, T. N. u. Koltover, V. K. (2006): Correlation between activity of antioxidant enzymes and circadian rhythms of corticosteroids in *Macaca mulatta* monkeys of different age. *Experimental Gerontology* 41 (8): 778–783.
- Greenberg, A. S. u. Obin, M. S. (2006): Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *The*

- American Journal of Clinical Nutrition 83 (2): 461S-465S.
- Griefahn, B.; Kunemund, C.; Brode, P. u. Mehnert, P. (2001): Zur Validität der deutschen Übersetzung des Morningness-Eveningness-Questionnaires von Horne und Östberg. The Validity of a German Version of the Morningness-Eveningness-Questionnaire. Developed by Horne and Östberg. *Somnologie* 5 (2): 71–80.
- Grune, T.; Jung, T.; Merker, K. u. Davies, K. J. A. (2004): Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (12): 2519–2530.
- Haen, E. u. Zulley, J. (1994): Chronomedizin. 1. Aufl. Regensburg: Roderer, S. 8.
- Haimov, I.; Laudon, M.; Zisapel, N.; Souroujon, M.; Nof, D.; Shlitner, A.; Herer, P.; Tzischinsky, O. u. Lavie, P. (1994): Sleep disorders and melatonin rhythms in elderly people. *BMJ (Clinical research ed.)* 309 (6948): 167.
- Halberg, F.; Haus, E. u. Stephens, A. /Hrsg. (1959): Susceptibility to ouabain and physiologic 24-hour periodicity. *Federation American Society Experimental Biology Rockville Pike*. 63-63.
- Halliwell, B. (2013): The antioxidant paradox: less paradoxical now? *British Journal of Clinical Pharmacology* 75 (3): 637–644.
- Hardeland, R. (2005): Antioxidative protection by melatonin. Multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 27 (2): 119–130.
- Hardeland, R. (2013): Melatonin and the theories of aging: a critical appraisal of melatonin's role in antiaging mechanisms. *Journal of Pineal Research* 55 (4): 325–356.
- Hardeland, R.; Coto-Montes, A. u. Poeggeler, B. (2003): Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms. *Chronobiology International* 20 (6): 921–962.
- Hardin, P. E. (2006): Essential and expendable features of the circadian timekeeping mechanism. *Current Opinion in Neurobiology* 16 (6): 686–692.
- Harman, D. (1956): Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology* 11 (3): 298–300.
- Harris, N.; Costa, V.; MacLean, M.; Mollapour, M.; Moradas-Ferreira, P. u. Piper, P. W. (2003): MnSOD overexpression extends the yeast chronological (G0) life span but acts independently of Sir2p histone deacetylase to shorten the replicative life span of dividing cells. *Free Radical Biology and Medicine* 34 (12): 1599–1606.
- Hastings, M. H. (1997): Circadian clocks. *Current Biology* 7 (11): R670-R672.
- Hastings, M. H.; Reddy, A. B.; Garabette, M.; King, V. M.; Chahad-Ehlers, S.; O'Brien, J. u. Maywood, E. S. (2003): Expression of clock gene products in the suprachiasmatic nucleus in relation to circadian behaviour. *Novartis Foundation Symposium* 253: 203-222.
- Hattori, A.; Migitaka, H.; Iigo, M.; Itoh, M.; Yamamoto, K.; Ohtani-Kaneko, R.; Hara, M.; Suzuki, T. u. Reiter, R. J. (1995): Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochemistry and Molecular Biology International* 35 (3): 627–634.
- Haus, E. u. Touitou, Y. (1992): *Principles of Clinical Chronobiology*. Heidelberg: Springer, S. 6-34.

- Heilbronn, L. K.; Jonge, L. de; Frisard, M. I.; DeLany, J. P.; Larson-Meyer, D. E.; Rood, J.; Nguyen, T.; Martin, C. K.; Volaufova, J. u. Most, M. M. (2006): Effect of 6-month calorie restriction on biomarkers of longevity, metabolic adaptation, and oxidative stress in overweight individuals. A randomized controlled trial. *Jama* 295 (13): 1539–1548.
- Henrich, G. u. Herschbach, P. (2000): Questions on life satisfaction (FLZM) - A short questionnaire for assessing subjective quality of life. *European Journal of Psychological Assessment* 16 (3): 150–159.
- Herljevic, M.; Middleton, B.; Thapan, K. u. Skene, D. J. (2005): Light-induced melatonin suppression. Age-related reduction in response to short wavelength light. *Experimental Gerontology* 40 (3): 237–242.
- Higuchi, S.; Motohashi, Y.; Liu, Y.; Ahara, M. u. Kaneko, Y. (2003): Effects of VDT tasks with a bright display at night on melatonin, core temperature, heart rate, and sleepiness. *Journal of Applied Physiology* 94 (5): 1773–1776.
- Hinerfeld, D.; Traini, M. D.; Weinberger, R. P.; Cochran, B.; Doctrow, S. R.; Harry, J. u. Melov, S. (2004): Endogenous mitochondrial oxidative stress. Neurodegeneration, proteomic analysis, specific respiratory chain defects, and efficacious antioxidant therapy in superoxide dismutase 2 null mice. *Journal of Neurochemistry* 88 (3): 657–667.
- Hodoğlugil, U.; Ongun, O.; Güney, Z.; Altan, N. u. Zengil, H. (1995): Temporal variation in hepatic superoxide dismutase activity in mice. *Chronobiology International* 12 (2): 152–155.
- Hofman, M. A. u. Swaab, D. F. (2006): Living by the clock. The circadian pace-maker in older people. *Ageing Research Reviews* 5 (1): 33–51.
- Hollerbuhl, T. (2015): Untersuchung von humanen circadianen Merkmalsystemen und der Nachtschlafstruktur unter Berücksichtigung von Alter und Schlafqualität. Dissertation, Fachbereich Biologie, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, 275 S.
- Horne, J. A. u. Östberg, O. (1976): A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *International Journal of Chronobiology* 4 (2): 97–110.
- Huang, T.-T.; Raineri, I.; Eggerding, F. u. Epstein, C. J. (2002): Transgenic and mutant mice for oxygen free radical studies. *Methods in Enzymology* 349: 191–213.
- Inal, M. E.; Kanbak, G. u. Sunal, E. (2001): Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clinica Chimica Acta* 305 (1-2): 75–80.
- Iriti, M.; Varoni, E. M. u. Vitalini, S. (2010): Melatonin in traditional Mediterranean diets. *Journal of Pineal Research* 49 (2): 101–105.
- Isojima, Y.; Okumura, N. u. Nagai, K. (2003): Molecular mechanism of mammalian circadian clock. *Journal of Biochemistry* 134 (6): 777–784.
- Jang, Y.-S.; Lee, M.-H.; Lee, S.-H. u. Bae, K. (2011): Cu/Zn superoxide dismutase is differentially regulated in period gene-mutant mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 409 (1): 22–27.
- Javanbakht, M.; Keshavarz, S.; Mirshafiey, A.; Djalali, M.; Siassi, F.; Eshraghian; Firooz, A.; Seirafi, H.; Ehsani, A. u. Chamari, M. (2010): The effects of vitamins e and d supplementation on erythrocyte superoxide dismutase and catalase in atopic dermatitis. *Iranian Journal of Public Health* 39 (1): 57–63.

- Jiménez-Ortega, V.; Cardinali, D. P.; Fernández-Mateos, M. P.; Ríos-Lugo, M. J.; Scacchi, P. A. u. Esquifino, A. I. (2010): Effect of cadmium on 24-hour pattern in expression of redox enzyme and clock genes in rat medial basal hypothalamus. *Biometals* 23 (2): 327–337.
- Jin, X.; Shearman, L. P.; Weaver, D. R.; Zylka, M. J.; Vries, G. J. de u. Reppert, S. M. (1999): A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 96 (1): 57–68.
- Johns, M. W. (1991): A new method for measuring daytime sleepiness. The Epworth sleepiness scale. *Sleep* 14 (6): 540–545.
- Kalsbeek, A. u. Buijs, R. M. (2002): Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell and Tissue Research* 309 (1): 109–118.
- Kanabrocki, E. L.; Murray, D.; Hermida, R. C.; Scott, G. S.; Bremner, W. F.; Ryan, M. D.; Ayala, D. E.; Third, J. L. H. C.; Shirazi, P.; Nemchausky, B. A. u. Hooper, D. C. (2002): Circadian variation in oxidative stress markers in healthy and type II diabetic men. *Chronobiology International* 19 (2): 423–439.
- Karaouzene, N.; Merzouk, H.; Aribi, M.; Merzouk, S. A.; Berrouiguet, A. Y.; Tessier, C. u. Narce, M. (2011): Effects of the association of aging and obesity on lipids, lipoproteins and oxidative stress biomarkers. A comparison of older with young men. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases* 21 (10): 792–799.
- Karasek, M. u. Reiter, R. J. (2002): Melatonin and aging. *Neuroendocrinology letters* 23 Suppl 1: 14–16.
- Karbovskyĭ, L. L.; Minchenko, D. O.; Garmash, I. A. u. Minchenko, O. G. (2011): Molecular mechanisms of circadian clock functioning. *Ukrains'kyi Biokhimichnyi Zhurnal* (1999) 83 (3): 5–24.
- Kawakami, F.; Okamura, H.; Tamada, Y.; Maebayashi, Y.; Fukui, K. u. Ibata, Y. (1997): Loss of day-night differences in VIP mRNA levels in the suprachiasmatic nucleus of aged rats. *Neuroscience Letters* 222 (2): 99–102.
- Kerkhof, G. A. u. van Dongen, H. P. (1996): Morning-type and evening-type individuals differ in the phase position of their endogenous circadian oscillator. *Neuroscience Letters* 218 (3): 153–156.
- Kessler, E.-M. u. Bowen, C. E. (2015): Resilience. *The Encyclopedia of Adulthood and Aging*: 1–5.
- Khalsa, S. B. S.; Jewett, M. E.; Cajochen, C. u. Czeisler, C. A. (2003): A phase response curve to single bright light pulses in human subjects. *The Journal of Physiology* 549 (3): 945–952.
- Kirkwood, T. B. L. (2008): A systematic look at an old problem. *Nature* 451 (7179): 644.
- Klein, D. C.; Berg, G. R.; Weller, J. u. Glinsmann, W. (1970): Pineal gland. Dibutyl cyclic adenosine monophosphate stimulation of labeled melatonin production. *Science (New York, N.Y.)* 167 (3926): 1738–1740.
- Klein, D. C.; Roseboom, P. H. u. Coon, S. L. (1996): New light is shining on the melatonin rhythm enzyme. The first postcloning view. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 7 (3): 106–112.
- Klein, E. M.; Brähler, E.; Dreier, M.; Reinecke, L.; Müller, K. W.; Schmutzer, G.; Wölfling, K. u. Beutel, M. E. (2016): The German version of the Perceived Stress Scale—psychometric characteristics in a representative German community sample. *BMC psychiatry* 16 (1): 159.

- Klerman, E. B.; Gershengorn, H. B.; Duffy, J. F. u. Kronauer, R. E. (2002): Comparisons of the variability of three markers of the human circadian pacemaker. *Journal of Biological Rhythms* 17 (2): 181–193.
- Klomsiri, C.; Karplus, P. A. u. Poole, L. B. (2011): Cysteine-based redox switches in enzymes. *Antioxidants & Redox Signaling* 14 (6): 1065–1077.
- Ko, C. H. u. Takahashi, J. S. (2006): Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics* 15 Suppl. 2: R271-277.
- Kolárová, H.; Bajgar, R.; Tománková, K.; Krestýn, E.; Dolezal, L. u. Hálek, J. (2007): In vitro study of reactive oxygen species production during photodynamic therapy in ultrasound-pretreated cancer cells. *Physiological Research* 56 Suppl 1: S27-32.
- Kondratov, R. V. (2007): A role of the circadian system and circadian proteins in aging. *Ageing Research Reviews* 6 (1): 12–27.
- Kondratov, R. V.; Kondratova, A. A.; Gorbacheva, V. Y.; Vykhovanets, O. V. u. Antoch, M. P. (2006): Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes & Development* 20 (14): 1868–1873.
- Kondratov, R. V.; Vykhovanets, O.; Kondratova, A. A. u. Antoch, M. P. (2009): Antioxidant N-acetyl-L-cysteine ameliorates symptoms of premature aging associated with the deficiency of the circadian protein BMAL1. *Ageing (Albany NY)* 1 (12): 979.
- Korf, H.-W. u. Stehle, J. H. (2005): Das circadiane System der Säugetiere—integraler Bestandteil des neuroendokrinen Systems. *Endokrinologie II, Vorträge im Rahmen des Projekts "Zeitstrukturen endokriner Systeme" Sächsische Akademie der Wissenschaften zu Leipzig*. Stuttgart: Hirzel, 9–31.
- Kotler, M.; Rodríguez, C.; Sáinz, R. M.; Antolín, I. u. Menéndez-Peláez, A. (1998): Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *Journal of Pineal Research* 24 (2): 83–89.
- Koubova, J. u. Guarente, L. (2003): How does calorie restriction work? *Genes & Development* 17 (3): 313–321.
- Kräuchi, K. (2002): How is the circadian rhythm of core body temperature regulated? *Clinical Autonomic Research* 12 (3): 147–149.
- Kräuchi, K.; Cajochen, C.; Werth, E. u. Wirz-Justice, A. (2000): Functional link between distal vasodilation and sleep-onset latency? *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 278 (3): R741-R748.
- Kräuchi, K. u. Deboer, T. (2011): Body temperature, sleep, and hibernation. *Principles and Practice of Sleep Medicine*: 323–334.
- Kräuchi, K. u. Wirz-Justice, A. (1994): Circadian rhythm of heat production, heart rate, and skin and core temperature under unmasking conditions in men. *American Journal of Physiology* 267 (3): R819-R829.
- Kyle, U. G.; Bosaeus, I.; Lorenzo, A. D. de; Deurenberg, P.; Elia, M.; Gómez, J. M.; Heitmann, B. L.; Kent-Smith, L.; Melchior, J.-C. u. Pirlich, M. (2004): Bioelectrical impedance analysis—part I. Review of principles and methods. *Clinical Nutrition* 23 (5): 1226–1243.
- Laakso, M. L.; Porkka-Heiskanen, T.; Alila, A.; Stenberg, D. u. Johansson, G. (1990): Correlation between salivary and serum melatonin. Dependence on serum melatonin levels. *Journal of Pineal Research* 9 (1): 39–50.

- Lacoste, M. G.; Ponce, I. T.; Golini, R. L.; Delgado, S. M. u. Anzulovich, A. C. (2017): Aging modifies daily variation of antioxidant enzymes and oxidative status in the hippocampus. *Experimental Gerontology* 88: 42–50.
- Lai, A. G.; Doherty, C. J.; Mueller-Roeber, B.; Kay, S. A.; Schippers, J. H. M. u. Dijkwel, P. P. (2012): Circadian clock associated 1 regulates ROS homeostasis and oxidative stress responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (42): 17129–17134.
- Lambeth, J. D. (2004): NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews. Immunology* 4 (3): 181–189.
- Landis, G. N. u. Tower, J. (2005): Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mechanisms of Ageing and Development* 126 (3): 365–379.
- Lane, E. A. u. Moss, H. B. (1985): Pharmacokinetics of melatonin in man: first pass hepatic metabolism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 61 (6): 1214–1216.
- Lee, K. A. (1988): Circadian temperature rhythms in relation to menstrual cycle phase. *Journal of Biological Rhythms* 3 (3): 255–263.
- Leibetseder, V.; Humpeler, S.; Svoboda, M.; Schmid, D.; Thalhammer, T.; Zuckermann, A.; Marktl, W. u. Ekmekcioglu, C. (2009): Clock genes display rhythmic expression in human hearts. *Chronobiology International* 26 (4): 621–636.
- Lenaz, G. (1998): Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochimica et Biophysica Acta* 1366 (1-2): 53–67.
- Levine, R. L. u. Stadtman, E. R. (2001): Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental Gerontology* 36 (9): 1495–1502.
- Lewy, A. J.; Cutler, N. L. u. Sack, R. L. (1999): The endogenous melatonin profile as a marker for circadian phase position. *Journal of Biological Rhythms* 14 (3): 227–236.
- Lewy, A. J.; Wehr, T. A.; Goodwin, F. K.; Newsome, D. A. u. Markey, S. P. (1980): Light suppresses melatonin secretion in humans. *Science (New York, N.Y.)* 210 (4475): 1267–1269.
- Lim, C. L.; Byrne, C. u. Lee, J. K. (2008): Human thermoregulation and measurement of body temperature in exercise and clinical settings. *Annals of the Academy of Medicine Singapore* 37 (4): 347–353.
- Lincoln, G. A.; Andersson, H. u. Hazlerigg, D. (2003): Clock genes and the long-term regulation of prolactin secretion: evidence for a photoperiod/circannual timer in the pars tuberalis. *Journal of Neuroendocrinology* 15 (4): 390–397.
- Liu, X.; Uchiyama, M.; Shibui, K.; Kim, K.; Kudo, Y.; Tagaya, H.; Suzuki, H. u. Okawa, M. (2000): Diurnal preference, sleep habits, circadian sleep propensity and melatonin rhythm in healthy human subjects. *Neuroscience Letters* 280 (3): 199–202.
- Luo, H.; Guo, H.; Xiao, J. u. Xue, Z. (1997): Circadian variations of plasma SOD and MDA in health subjects. *Journal of West China University of Medical Sciences* 28 (4): 401–403.
- Luttmann, W.; Bratke, K.; Küpper, M. u. Myrtek, D. (2006): *Der Experimentator Immunologie*, 2. Aufl., München: Urban und Fischer, Elsevier, S. 142.
- Martín, V.; Sainz, R. M.; Mayo, J. C.; Antolín, I.; Herrera, F. u. Rodríguez, C. (2003): Daily rhythm of gene expression in rat superoxide dismutases. *Endocrine Research* 29 (1): 83–95.

- Marzatico, F.; Pansarasa, O.; Bertorelli, L.; Somenzini, L. u. Della Valle, G. (1997): Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness* 37 (4): 235–239.
- Mathew, L.; Purkayastha, S. S.; Singh, R. u. Gupta, J. S. (1986): Influence of aging in the thermoregulatory efficiency of man. *International Journal of Biometeorology* 30 (2): 137–145.
- Mayo, J. C.; Sainz, R. M.; Antoli, I.; Herrera, F.; Martin, V. u. Rodriguez, C. (2002): Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59 (10): 1706–1713.
- Maywood, E. S.; O'Brien, J. A. u. Hastings, M. H. (2003): Expression of mCLOCK and other circadian clock-relevant proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Journal of Neuroendocrinology* 15 (4): 329–334.
- McCord, J. M. u. Fridovich, I. (1969): Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry* 244 (22): 6049–6055.
- Meli, M.; Frey, J. u. Perier, C. (2003): Native protein glycooxidation and aging. *The Journal of Nutrition, Health & Aging* 7 (4): 263–266.
- Messenger, S.; Hazlerigg, D. G.; Mercer, J. G. u. Morgan, P. J. (2000): Photoperiod differentially regulates the expression of Per1 and ICER in the pars tuberalis and the suprachiasmatic nucleus of the Siberian hamster. *The European Journal of Neuroscience* 12 (8): 2865–2870.
- Messenger, S.; Ross, A. W.; Barrett, P. u. Morgan, P. J. (1999): Decoding photoperiodic time through Per1 and ICER gene amplitude. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (17): 9938–9943.
- Meyer, P. T.; Elmenhorst, D.; Boy, C.; Winz, O.; Matusch, A.; Zilles, K. u. Bauer, A. (2007): Effect of aging on cerebral A1 adenosine receptors. A [18F] CFPX PET study in humans. *Neurobiology of Aging* 28 (12): 1914–1924.
- Mezzetti, A.; Lapenna, D.; Romano, F.; Costantini, F.; Pierdomenico, S. D.; Cesare, D. de; Cucurullo, F.; Riario-Sforza, G.; Zuliani, G. u. Fellin, R. (1996): Systemic oxidative stress and its relationship with age and illness. *Journal of the American Geriatrics Society* 44 (7): 823–827.
- Miles, L. E. u. Dement, W. C. (1980): Sleep and Aging. *Sleep* 3 (2): 1–220.
- Mohr, H. u. Schopfer, P. (2013): *Lehrbuch der Pflanzenphysiologie*. Heidelberg: Springer-Verlag, S. 240.
- Monk, T. H. (2005): Aging human circadian rhythms. Conventional wisdom may not always be right. *Journal of Biological Rhythms* 20 (4): 366–374.
- Monk, T. H. u. Buysse, D. J. (2013): Exposure to shift work as a risk factor for diabetes. *Journal of Biological Rhythms* 28 (5): 356–359.
- Monk, T. H.; Buysse, D. J.; Carrier, J.; Billy, B. D. u. Rose, L. R. (2001): Effects of afternoon “siesta” naps on sleep, alertness, performance, and circadian rhythms in the elderly. *Sleep* 24 (6): 680–687.
- Monk, T. H.; Buysse, D. J.; Reynolds, C. F.; Kupfer, D. J. u. Houck, P. R. (1995): Circadian temperature rhythms of older people. *Experimental Gerontology* 30 (5): 455–474.
- Monk, T. H. u. Kupfer, D. J. (2000): Circadian rhythms in healthy aging—effects downstream from the pacemaker. *Chronobiology International* 17 (3): 355–368.

- Moore, R. Y.; Speh, J. C. u. Leak, R. K. (2002): Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell and Tissue Research* 309 (1): 89–98.
- Müller, M. J. (2007): Ernährungsmedizinische Praxis. Methoden-Prävention-Behandlung. Heidelberg: Springer-Verlag, S. 808-809.
- Müller, W. A.; Frings, S. u. Möhrlein, F. (2019): Biologische Rhythmen und innere Uhren. In: Tier- und Humanphysiologie. Springer: 781–809.
- Murch, S. J.; Hall, B. A.; Le, C. H. u. Saxena, P. K. (2010): Changes in the levels of indoleamine phytochemicals during véraison and ripening of wine grapes. *Journal of Pineal Research* 49 (1): 95–100.
- Murphy, P. J.; Myers, B. L. u. Badia, P. (1996): Nonsteroidal anti-inflammatory drugs alter body temperature and suppress melatonin in humans. *Physiology & Behavior* 59 (1): 133–139.
- Mutoh, T.; Shibata, S.; Korf, H.-W. u. Okamura, H. (2003): Melatonin modulates the light-induced sympathoexcitation and vagal suppression with participation of the suprachiasmatic nucleus in mice. *The Journal of Physiology* 547 (Pt 1): 317–332.
- Nakamura, T. J.; Nakamura, W.; Yamazaki, S.; Kudo, T.; Cutler, T.; Colwell, C. S. u. Block, G. D. (2011): Age-related decline in circadian output. *The Journal of Neuroscience* 31 (28): 10201–10205.
- Nohl, H. (1993): Involvement of free radicals in ageing: a consequence or cause of senescence. *British Medical Bulletin* 49 (3): 653–667.
- Norman, K.; Stobäus, N.; Smoliner, C.; Lochs, H. u. Pirlich, M. (2007): Effekte einer Ernährungstherapie auf Körperzusammensetzung und -funktion. *Aktuelle Ernährungsmedizin* 32 (3): 99–103.
- Nygård, M.; Hill, R. H.; Wikström, M. A. u. Kristensson, K. (2005): Age-related changes in electrophysiological properties of the mouse suprachiasmatic nucleus in vitro. *Brain Research Bulletin* 65 (2): 149–154.
- Obayashi, K.; Saeki, K.; Iwamoto, J.; Okamoto, N.; Tomioka, K.; Nezu, S.; Ikada, Y. u. Kurumatani, N. (2012): Positive effect of daylight exposure on nocturnal urinary melatonin excretion in the elderly. A cross-sectional analysis of the HEIJO-KYO study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97 (11): 4166–4173.
- Okamura, H. (2003): Integration of molecular rhythms in the mammalian circadian system. *Novartis Foundation Symposium* 253: 161-70.
- Okamura, H.; Yamaguchi, S. u. Yagita, K. (2002): Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell and Tissue Research* 309 (1): 47–56.
- Olbrich, D. (2010): Chronobiologische Markersysteme im Rahmen menschlicher Alternsprozesse. Untersuchung zur Veränderung der circadianen Rhythmik von Uhrengen-Expression, Hormonsynthese und Körperkerntemperatur sowie deren Interaktionen. Dissertation, Fachbereich Biologie, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, 236 S.
- Olbrich, D. u. Dittmar, M. (2011): Older poor-sleeping women display a smaller evening increase in melatonin secretion and lower values of melatonin and core body temperature than good sleepers. *Chronobiology International* 28 (8): 681–689.
- Oliver, C. N.; Ahn, B. W.; Moerman, E. J.; Goldstein, S. u. Stadtman, E. R. (1987): Age-related changes in oxidized proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 262 (12): 5488–5491.

- Ottinger, M. A.; Mobarak, M.; Abdelnabi, M.; Roth, G.; Proudman, J. u. Ingram, D. K. (2005): Effects of calorie restriction on reproductive and adrenal systems in Japanese quail: are responses similar to mammals, particularly primates? *Mechanisms of Ageing and Development* 126 (9): 967–975.
- Özbay, B. u. Dülger, H. (2002): Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in Turkish population: relation to age, gender, exercise, and smoking. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 197 (2): 119–124.
- Ozturk, G.; Coşkun, S.; Erbaş, D. u. Hasanoglu, E. (2000): The effect of melatonin on liver superoxide dismutase activity, serum nitrate and thyroid hormone levels. *The Japanese Journal of Physiology* 50 (1): 149–153.
- Pacifici, R. E. u. Davies, K. J. (1991): Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress. The free-radical theory of aging revisited. *Gerontology* 37 (1-3): 166–180.
- Palma-Anzures, I.; Prieto-Sagredo, J. u. Fanjul-Moles, M. L. (2012): Temperature pulses synchronise the crayfish locomotor activity rhythm. *Biological Rhythm Research* 43 (1): 15–24.
- Pandi-Perumal, S. R.; Seils, L. K.; Kayumov, L.; Ralph, M. R.; Lowe, A.; Moller, H. u. Swaab, D. F. (2002): Senescence, sleep, and circadian rhythms. *Ageing Research Reviews* 1 (3): 559–604.
- Pandi-Perumal, S. R.; Trakht, I.; Srinivasan, V.; Spence, D. W.; Maestroni, G. J. M.; Zisapel, N. u. Cardinali, D. P. (2008): Physiological effects of melatonin. Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Progress in Neurobiology* 85 (3): 335–353.
- Paredes, S. D.; Korkmaz, A.; Manchester, L. C.; Tan, D.-x. u. Reiter, R. J. (2009): Phytomelatonin: a review. *Journal of Experimental Botany* 60 (1): 57–69.
- Payne, J. K. (2006): The trajectory of biomarkers in symptom management for older adults with cancer. *Seminars in Oncology Nursing* 22 (1): 31–35.
- Pearl, R. (1928): *The rate of living*. London: University Press, S. 146-151.
- Peschke, E.; Fauteck, J. D.; Musshoff, U.; Schmidt, F.; Beckmann, A. u. Peschke, D. (2000): Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. *Journal of Pineal Research* 28 (3): 156–164.
- Petrov, M. E.; Clark, C. B.; Molzof, H. E.; Johnson, R. L.; Cropsey, K. L. u. Gamble, K. L. (2014): Sleep strategies of night-shift nurses on days off. Which Ones are Most Adaptive? *Frontiers in Neurology* 5: 277.
- Pevet, P. (2000): Melatonin and biological rhythms. *Neurosignals* 9 (3-4): 203–212.
- Poeggeler, B.; Reiter, R. J.; Tan, D. X.; Chen, L. D. u. Manchester, L. C. (1993): Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis. *Journal of Pineal Research* 14 (4): 151–168.
- Powers, S. K. u. Lennon, S. L. (1999): Analysis of cellular responses to free radicals. Focus on exercise and skeletal muscle. *Proceedings of the Nutrition Society* 58 (4): 1025–1033.
- Provencio, I.; Jiang, G.; Grip, W. J. de; Hayes, W. P. u. Rollag, M. D. (1998): Melanopsin. An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (1): 340–345.
- Provencio, I.; Rodriguez, I. R.; Jiang, G.; Hayes, W. P.; Moreira, E. F. u. Rollag, M. D. (2000): A Novel Human Opsin in the Inner Retina. *The Journal of Neuroscience* 20 (2): 600–605.

- Radák, Z.; Kaneko, T.; Tahara, S.; Nakamoto, H.; Ohno, H.; Sasvári, M.; Nyakas, C. u. Goto, S. (1999): The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle. Evidence for beneficial outcomes. *Free Radical Biology & Medicine* 27 (1-2): 69–74.
- Ramakrishna, A.; Giridhar, P.; Sankar, K. U. u. Ravishankar, G. A. (2012): Melatonin and serotonin profiles in beans of *Coffea* species. *Journal of Pineal Research* 52 (4): 470–476.
- Razali, N. M. u. Wah, Y. B. (2011): Power comparisons of shapiro-wilk, kolmogorov-smirnov, lilliefors and anderson-darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics* 2 (1): 21–33.
- Refinetti, R. u. Menaker, M. (1992): The circadian rhythm of body temperature. *Physiology & Behavior* 51 (3): 613–637.
- Reisner, A. H.; Nemes, P. u. Bucholtz, C. (1975): The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 64 (2): 509–516.
- Reiter, R. J.; Manchester, L. C. u. Tan, D.-x. (2005): Melatonin in walnuts: influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 21 (9): 920–924.
- Reiter, R. J.; Rosales-Corral, S. A.; Liu, X. Y.; Acuna-Castroviejo, D.; Escames, G. u. Tan, D.-X. (2015): Melatonin in the oral cavity. Physiological and pathological implications. *Journal of Periodontal Research* 50 (1): 9–17.
- Reiter, R. J.; Tan, D. X. u. Galano, A. (2014): Melatonin: exceeding expectations. *Physiology (Bethesda, Md.)* 29 (5): 325–333.
- Reppert, S. M.; Schwartz, W. J. u. Uhl, G. R. (1987): Arginine vasopressin. A novel peptide rhythm in cerebrospinal fluid. *Trends in Neurosciences* 10 (2): 76–80.
- Reppert, S. M. u. Weaver, D. R. (2002): Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418 (6901): 935–941.
- Rodriguez, C.; Mayo, J. C.; Sainz, R. M.; Antolín, I.; Herrera, F.; Martín, V. u. Reiter, R. J. (2004): Regulation of antioxidant enzymes. A significant role for melatonin. *Journal of Pineal Research* 36 (1): 1–9.
- Roenneberg, T. (2012): What is chronotype? *Sleep and Biological Rhythms* 10 (2): 75–76.
- Rose, D. M.; Jung, D.; Parera, D. u. Konietzko, J. (1999): Time zone shifts and jet lag after long-distance flights. *Zeitschrift für ärztliche Fortbildung und Qualitätssicherung* 93 (7): 485–490.
- Sack, R. L.; Lewy, A. J.; Erb, D. L.; Vollmer, W. M. u. Singer, C. M. (1986): Human Melatonin Production Decreases With Age. *Journal of Pineal Research* 3 (4): 379–388.
- Sarlak, G.; Jenwitheesuk, A.; Chetsawang, B. u. Govitrapong, P. (2013): Effects of melatonin on nervous system aging. *Neurogenesis and Neurodegeneration. Journal of Pharmacological Sciences* 123 (1): 9–24.
- Savaskan, E.; Ayoub, M. A.; Ravid, R.; Angeloni, D.; Fraschini, F.; Meier, F.; Eckert, A.; Müller-Spahn, F. u. Jockers, R. (2005): Reduced hippocampal MT2 melatonin receptor expression in Alzheimer's disease. *Journal of Pineal Research* 38 (1): 10–16.
- Scherholz, M. L.; Schlesinger, N. u. Androulakis, I. P. (2019): Chronopharmacology of glucocorticoids. *Advanced Drug Delivery Reviews* 151-152: 245–261.

- Scholtens, R. M.; van Munster, B. C.; van Kempen, M. F. u. Rooij, S. E. J. A. de (2016): Physiological melatonin levels in healthy older people. A systematic review. *Journal of Psychosomatic Research* 86: 20–27.
- Schomerus, C.; Korf, H. W.; Laedtke, E.; Weller, J. L. u. Klein, D. C. (2000): Selective adrenergic/cyclic AMP-dependent switch-off of proteasomal proteolysis alone switches on neural signal transduction. An example from the pineal gland. *Journal of Neurochemistry* 75 (5): 2123–2132.
- Schomerus, C.; Laedtke, E. u. Korf, H. W. (1995): Calcium responses of isolated, immunocytochemically identified rat pinealocytes to noradrenergic, cholinergic and vasopressinergic stimulations. *Neurochemistry International* 27 (2): 163–175.
- Sedmak, J. J. u. Grossberg, S. E. (1977): A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Analytical Biochemistry* 79 (1-2): 544–552.
- Serra, V.; Zglinicki, T. von; Lorenz, M. u. Saretzki, G. (2003): Extracellular superoxide dismutase is a major antioxidant in human fibroblasts and slows telomere shortening. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (9): 6824–6830.
- Shacter, E. (2000): Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Reviews* 32 (3-4): 307–326.
- Sharma, M.; Palacios-Bois, J.; Schwartz, G.; Iskandar, H.; Thakur, M.; Quirion, R. u. Nair, N. P. (1989): Circadian rhythms of melatonin and cortisol in aging. *Biological Psychiatry* 25 (3): 305–319.
- Sharma, V. K. (2003): Adaptive significance of circadian clocks. *Chronobiology International* 20 (6): 901–919.
- Sherman, B.; Wysham, C. u. Pfohl, B. (1985): Age-related changes in the circadian rhythm of plasma cortisol in man. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 61 (3): 439–443.
- Shi, X.; Dalal, N. S. u. Jain, A. C. (1991): Antioxidant behaviour of caffeine. Efficient scavenging of hydroxyl radicals. *Food and chemical toxicology* 29 (1): 1–6.
- Shigenaga, M. K.; Hagen, T. M. u. Ames, B. N. (1994): Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (23): 10771–10778.
- Simm, A.; Müller, B.; Nass, N.; Hofmann, B.; Bushnaq, H.; Silber, R.-E. u. Bartling, B. (2015): Protein glycation - Between tissue aging and protection. *Experimental Gerontology* 68: 71–75.
- Singh, R.; Singh, R. K.; Mahdi, A. A.; Singh, R. K.; Kumar, A.; Tripathi, A. K.; Rai, R.; Singh, U.; Cornélissen, G.; Schwartzkopff, O. u. Halberg, F. (2003): Circadian periodicity of plasma lipid peroxides and other anti-oxidants as putative markers in gynecological malignancies. *In Vivo (Athens, Greece)* 17 (6): 593–600.
- Singh, R.; Singh, R. K.; Tripathi, A. K.; Cornélissen, G.; Schwartzkopff, O.; Otsuka, K. u. Halberg, F. (2005): Chronomics of circulating plasma lipid peroxides and anti-oxidant enzymes and other related molecules in cirrhosis of liver. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 59 Suppl 1: S229-35.
- Skene, D. J. u. Swaab, D. F. (2003): Melatonin rhythmicity. Effect of age and Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology* 38 (1-2): 199–206.

- Smeal, T. u. Guarente, L. (1997): Mechanisms of cellular senescence. *Current Opinion in Genetics & Development* 7 (2): 281–287.
- Sohal, R. S. (1993): The free radical hypothesis of aging. An appraisal of the current status. *Aging Clinical and Experimental Research* 5 (1): 3–17.
- Sohal, R. S. (2002): Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radical Biology & Medicine* 33 (1): 37–44.
- Sohal, R. S.; Agarwal, S. u. Sohal, B. H. (1995): Oxidative stress and aging in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Mechanisms of Ageing and Development* 81 (1): 15–25.
- Sohal, R. S. u. Orr, W. C. (2012): The redox stress hypothesis of aging. *Free Radical Biology & Medicine* 52 (3): 539–555.
- Sohal, R. S. u. Weindruch, R. (1996): Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science (New York, N.Y.)* 273 (5271): 59–63.
- Spielmann, J.; Bähr, I.; Naujoks, W.; Kielstein, H. u. Quandt, D. (2019): Natürliche Killerzellen, Adipositas & Tumorgenese. *Adipositas - Ursachen, Folgeerkrankungen, Therapie* 13 (01): 36–42.
- Srinath, R.; Acharya, A. B. u. Thakur, S. L. (2010): Salivary and gingival crevicular fluid melatonin in periodontal health and disease. *Journal of Periodontology* 81 (2): 277–283.
- Stehle, J. H.; Gall, C. von; Schomerus, C. u. Korf, H. W. (2001): Of rodents and ungulates and melatonin. Creating a uniform code for darkness by different signaling mechanisms. *Journal of Biological Rhythms* 16 (4): 312–325.
- Stohs, S. J. (1995): The role of free radicals in toxicity and disease. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* 6 (3-4): 205–228.
- Szweda, P. A.; Friguet, B. u. Szweda, L. I. (2002): Proteolysis, free radicals, and aging. *Free Radical Biology & Medicine* 33 (1): 29–36.
- Taillard, J.; Philip, P.; Chastang, J.-F. u. Bioulac, B. (2004): Validation of Horne and Ostberg morningness-eveningness questionnaire in a middle-aged population of French workers. *Journal of Biological Rhythms* 19 (1): 76–86.
- Tamarkin, L.; Danforth, D.; Lichter, A.; DeMoss, E.; Cohen, M.; Chabner, B. u. Lippman, M. (1982): Decreased nocturnal plasma melatonin peak in patients with estrogen receptor positive breast cancer. *Science (New York, N.Y.)* 216 (4549): 1003–1005.
- Temneanu, R. O.; Motoc, A.; Zugun, F. E.; Folescu, R.; Lupuşoru, C. E. u. Zamfir, C. L. (2012): The relevance of circadian rhythms disruption on pulmonary SOD expression in rat. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 53 (3 Suppl): 789–793.
- Thapan, K.; Arendt, J. u. Skene, D. J. (2001): An action spectrum for melatonin suppression. Evidence for a novel non-rod, non-cone photoreceptor system in humans. *The Journal of Physiology* 535 (Pt 1): 261–267.
- Tóthová, L.'u.; Celecová, V. u. Celec, P. (2013): Salivary markers of oxidative stress and their relation to periodontal and dental status in children. *Disease Markers* 34 (1): 9–15.
- Touitou, Y. (2001): Human aging and melatonin. Clinical relevance. *Experimental Gerontology* 36 (7): 1083–1100.
- Tunc, O.; Bakos, H. W. u. Tremellen, K. (2011): Impact of body mass index on seminal oxidative stress. *Andrologia* 43 (2): 121–128.

- Turrens, J. F. (2003): Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology* 552 (Pt 2): 335–344.
- Vakkuri, O.; Leppäluoto, J. u. Kauppila, A. (1985): Oral administration and distribution of melatonin in human serum, saliva and urine. *Life Sciences* 37 (5): 489–495.
- Veglia, F.; Cighetti, G.; Franceschi, M. de; Zingaro, L.; Boccotti, L.; Tremoli, E. u. Cavalca, V. (2006): Age- and gender-related oxidative status determined in healthy subjects by means of OXY-SCORE, a potential new comprehensive index. *Biomarkers* 11 (6): 562–573.
- Voultios, A.; Kennaway, D. J. u. Dawson, D. (1997): Salivary melatonin as a circadian phase marker. Validation and comparison to plasma melatonin. *Journal of Biological Rhythms* 12 (5): 457–466.
- Vuori, I.; Urponen, H.; Hasan, J. u. Partinen, M. (1988): Epidemiology of exercise effects on sleep. *Acta Physiologica Scandinavica, Suppl* 574: 3–7.
- Waddell, B. J.; Wharfe, M. D.; Crew, R. C. u. Mark, P. J. (2012): A rhythmic placenta? Circadian variation, clock genes and placental function. *Placenta* 33 (7): 533–539.
- Waldhauser, F.; Waldhauser, M.; Lieberman, H. R.; Deng, M. H.; Lynch, H. J. u. Wurtman, R. J. (1984): Bioavailability of oral melatonin in humans. *Neuroendocrinology* 39 (4): 307–313.
- Wasowicz, W.; Kantorski, J.; Perek, D. u. Popadiuk, S. (1989): Concentration of zinc and zinc-copper superoxide dismutase activity in red blood cells in normals and children with cancer. *Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry. Zeitschrift für klinische Chemie und klinische Biochemie* 27 (7): 413–418.
- Weinert, D. (2010): Circadian temperature variation and ageing. *Ageing Research Reviews* 9 (1): 51–60.
- Weitzman, E. D.; Moline, M. L.; Czeisler, C. A. u. Zimmerman, J. C. (1982): Chronobiology of aging: temperature, sleep-wake rhythms and entrainment. *Neurobiology of Aging* 3 (4): 299–309.
- Wonisch, W.; Falk, A.; Sundl, I.; Winklhofer-Roob, B. M. u. Lindschinger, M. (2012): Oxidative stress increases continuously with BMI and age with unfavourable profiles in males. *The Aging Male* 15 (3): 159–165.
- Wright Jr., K. P.; Badia, P.; Myers, B. L.; Plenzler, S. C. u. Hakel, M. (1997): Caffeine and light effects on nighttime melatonin and temperature levels in sleep-deprived humans. *Brain Research* 747 (1): 78–84.
- Wu, Y.-H. u. Swaab, D. F. (2007): Disturbance and strategies for reactivation of the circadian rhythm system in aging and Alzheimer's disease. *Sleep Medicine* 8 (6): 623–636.
- Xu, Y.-Q.; Zhang, D.; Jin, T.; Cai, D.-J.; Wu, Q.; Lu, Y.; Liu, J. u. Klaassen, C. D. (2012): Diurnal variation of hepatic antioxidant gene expression in mice. *PloS One* 7 (8): e44237.
- Yamazaki, S.; Straume, M.; Tei, H.; Sakaki, Y.; Menaker, M. u. Block, G. D. (2002): Effects of aging on central and peripheral mammalian clocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (16): 10801–10806.
- Yoshida, Y.; Iigusa, H.; Wang, N. u. Hasunuma, K. (2011): Cross-talk between the cellular redox state and the circadian system in *Neurospora*. *PloS One* 6 (12): e28227.

Young, I. S. u. McEneny, J. (2001): Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions* 29 (Pt 2): 358–362.

Yu, B. P. (1993): Oxidative damage by free radicals and lipid peroxidation in aging. *Free Radicals in Aging*: 57–88.

Yu, B. P. (2006): Why calorie restriction would work for human longevity. *Biogerontology* 7 (3): 179–182.

Zeitzer, J. M.; Daniels, J. E.; Duffy, J. F.; Klerman, E. B.; Shanahan, T. L.; Dijk, D. J. u. Czeisler, C. A. (1999): Do plasma melatonin concentrations decline with age? *The American Journal of Medicine* 107 (5): 432–436.

Zelko, I. N.; Mariani, T. J. u. Folz, R. J. (2002): Superoxide dismutase multigene family. A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology & Medicine* 33 (3): 337–349.

Zepelin, H. u. McDonald, C. S. (1987): Age differences in autonomic variables during sleep. *Journal of Gerontology* 42 (2): 142–146.

Zhang, H.-M. u. Zhang, Y. (2014): Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *Journal of Pineal Research* 57 (2): 131–146.

Zhao, Z.-Y.; Xie, Y.; Fu, Y.-R.; Bogdan, A. u. Touitou, Y. (2002): Aging and the circadian rhythm of melatonin. A cross-sectional study of Chinese subjects 30-110 yr of age. *Chronobiology International* 19 (6): 1171–1182.

Ziech, D.; Franco, R.; Pappa, A. u. Panayiotidis, M. I. (2011): Reactive oxygen species (ROS)--induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutation Research* 711 (1-2): 167–173.

INTERNETQUELLEN

URL 1:

<https://slideplayer.com/slide/12642936/>

23.07.2019, 16:42 Uhr

URL 2 und 3:

<https://www.pharmazeutische-zeitung.de/ausgabe-362010/wenn-medikamente-wachhalten/>

03.09.2019, 14:15 Uhr

URL 4:

<https://www.bib.bund.de/DE/Fakten/Fakt/W18-Lebenserwartung-Laendergruppen-Entwicklungsstand-ab-1950.html>

11.12.2019, 13:42 Uhr

URL 5:

https://www.bsd-selbsthilfe.de/fileadmin/user_upload/PDF/fragebogen-selbstdiagnose-2011.pdf

08.11.2019, 10:32 Uhr

URL 6 und 7:

<https://www.caymanchem.com/pdfs/589320.pdf>

03.09.2019, 14:31 Uhr

URL 8:

https://lifescience.roche.com/en_de/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center

14.11.2019, 18:27 Uhr

URL 9:

<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>

14.11.2019, 18:26 Uhr

URL 10:

<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/D085075.pdf>

03.09.2019, 14:17 Uhr

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	alpha
AANAT	Arylalkylamin- <i>N</i> -acetyltransferase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>Arntl</i>	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
BCM	Körperzellmasse
BIA	Bioelektrische Impedanzanalyse
<i>Bmal1</i>	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like = Mop3 = Arntl</i>
BMI	<i>Body Mass Index</i>
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CCGs	Uhrengen-kontrollierte Gene (<i>clock controlled genes</i>)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
<i>Clock</i>	<i>Circadian locomotor output cycles kaput protein</i>
CP	<i>Crossing Point</i>
CR	<i>Caloric Restriction</i>
<i>CRY</i>	<i>Cryptochrom Circadian Clock</i>
Cu/Zn	Kupfer/Zink
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DGSM	Deutsche Gesellschaft für Schlafforschung und Schlafmedizin
D-MEQ	Deutsche Version des <i>Morningness-Eveningness Questionnaire</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleotid-Triphosphat
E	Effizienz
ECM	Extrazellulärmasse
ECW	Extrazellulärwasser
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (= Enzymimmunoassay)
ESS	Epworth Sleepiness Scale
FM	Fettmasse
FFM	Fettfreie Masse
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
H ₂ O ₂	Dihydrogenperoxid
Hz	Hertz
<i>hBmal1</i> bzw. <i>hArntl</i>	<i>Humanes Brain and Muscle ARNT-like 1</i>
<i>hRPLP0</i> (= <i>h36B4</i>)	<i>Humanes Acidic Ribosomal Phosphoprotein P0</i>
<i>hSod1</i>	<i>Humane Superoxiddismutase 1</i>
ICW	Intrazelluläres Wasser
ipRGCs	Photosensitive retinale Ganglionzellen
kDa	Kilo-Dalton

KKT	Körperkerntemperatur
LBM	Magermasse
LC	Light Cycler
µL	Mikroliter
m	Meter
mA	Milliampere
Mesor	<i>midline estimating statistic of rhythm</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MSH	Mundschleimhaut
mt	Mitochondrial
N	Probandenanzahl
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
OS	Oxidativer Stress
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAR	Proline and Acidic amino acid-rich Protein
PER	<i>Period circadian clock</i>
PSQI	<i>Pittsburgh Sleep Quality Index</i>
r	Korrelationskoeffizient
REV-ERBα	<i>nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1</i>
RHT	Retinohypothalamischer Trakt
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	<i>reactive nitrogen species</i> = freie Stickstoffradikale
ROS	<i>reactive oxygen species</i> = freie Sauerstoffradikale
RT	Raumtemperatur
qRT-PCR	quantitative Echtzeit (<i>real time</i>)-Polymerase Kettenreaktion
SCN	Suprachiasmatischer Nucleus
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBW	Gesamtkörperwasser
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UPL	<i>Universal ProbeLibrary</i>

11 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Mesor, Amplitude, Periode und Akrophase	2
Abb. 2: Molekulare Rückkopplungsschleife der inneren Uhr bei Säugetieren	7
Abb. 3: Melatonin synthese und –signalweg	10
Abb. 4: Melatoninmolekül, Tageszeitliche Rhythmik und Veränderungen mit dem Alter	12
Abb. 5: Verlauf der Hauttemperatur (A) und der Körperkerntemperatur (B)	23
Abb. 6: Schema des 24-stündigen Versuchstages.....	27
Abb. 7: Oxidation von Guanosin durch ROS und RNS	45
Abb. 8: Schema des ELISA zum Oxidativen Stressnachweis via oxidativ geschädigtem Guanin	46
Abb. 9: Aufbau des Wet Blots	62
Abb. 10: Spezifischer enzymatischer Nachweis eines membrangebundenen Antigens	64
Abb. 11: Ausschnitt des Gelbildes der Gradienten PCR für das <i>hSod1</i> -Gen.	67
Abb. 12: Fluoreszenzsignal der LC-PCR für das <i>hSod1</i> -Gen mit 40 Zyklen und der Annealingtemperatur von 58° C.	68
Abb. 13: Crossingpoints (Cro...) der LC-PCR für das <i>hSod1</i> -Gen	68
Abb. 14: Standardkurve für das Haushaltsgen (Referenzgen) <i>h36B4</i>	70
Abb. 15: Standardkurve für das Uhrengen <i>hBmal1</i>	70
Abb. 16: Standardkurve für das Superoxiddismutasegen <i>hSod1</i>	70
Abb. 17: Exemplarisches Gelbild eines Western Blots.....	71
Abb. 18: Punktezahlen im Deutschen „Mornigness-Evenigness-Questionnaire“ bei 21 jüngeren und 21 älteren Frauen	75
Abb. 19: Verteilung von Morgen- und Neutraltypen bei 21 jüngeren Frauen	75
Abb. 20: Stress und Lebenszufriedenheit – mittlere Punktzahlen und Standardabweichungen aus den Fragebögen	77
Abb. 21: Verteilung der Selbstbeurteilung des Gesundheitszustandes.....	78
Abb. 22: Grauer Star als altersassoziierte Veränderung bei 21 älteren Frauen	79
Abb. 23: Ernährungsgewohnheiten von jüngeren und älteren Frauen	80
Abb. 24: Zeit im Freien und Sportgewohnheiten von jüngeren und älteren Frauen	82
Abb. 25: Körperkerntemperatur oral (° C) bei jüngeren und älteren Frauen	84

Abb. 26: periphere Hauttemperatur am Fuß (° C) jüngerer und älterer Frauen	86
Abb. 27: Circadiane Rhythmik der peripheren Hauttemperatur von 21 jüngeren und 20 älteren Probandinnen	89
Abb. 28: <i>hBmal1/h36B4</i> -Ratio (Gen) bei jüngeren und älteren Frauen	90
Abb. 29: <i>hSod1/h36B4</i> -Ratio (Gen) bei jüngeren und älteren Frauen.....	92
Abb. 30: SOD1/ β -Aktin-Ratio (Protein) bei jüngeren und älteren Frauen.....	94
Abb. 31: Oxidativer Stress: 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosin (pg/mL) bei jüngeren und älteren Frauen	96
Abb. 32: Melatonin-Konzentration (pg/mL) bei jüngeren und älteren Frauen	98
Abb. 33: Korrelationen in der Gesamtgruppe zwischen <i>hBmal1</i> -Gen und <i>hSod1</i> -Gen.....	100
Abb. 34: Korrelationen älterer (a) und jüngerer (b) Frauen zwischen <i>hBmal1</i> -Gen und <i>hSod1</i> - Gen	101
Abb. 35: Korrelationen in der Gesamtgruppe zwischen <i>hBmal1</i> -Gen und der Melatoninkonzentration	107
Abb. 36: Korrelationen älterer (a) und jüngerer (b) Frauen zwischen <i>hBmal1</i> -Gen und der Melatoninkonzentration	110
Abb. 37: Korrelationen in der Gesamtgruppe zwischen der Melatoninkonzentration und Nickerchen bzw. der Morgenpräferenz	115
Abb. 38: Korrelationen in der Gesamtgruppe zwischen dem oxidativen Stress (OS) und dem Body-Mass-Index (BMI).....	117
Abb. 39: Korrelationen zwischen dem subjektiven Stress und der Lebenszufriedenheit bei jüngeren und älteren Frauen	118

12 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Material	33
Tab. 2: Primer aller verwendeten Gene	51
Tab. 3: Mastermix für Gradienten-PCR	52
Tab. 4: Programm für Gradienten-PCR mit dem „ <i>hSod1-40</i> Primer“	52
Tab. 5: Komponenten für den einfachen LC-PCR-Ansatz.....	55
Tab. 6: Programm für eine Light-Cycler-PCR.....	56
Tab. 7: Bestandteile des verwendeten Zelllyse-Puffers (NP-40).....	58
Tab. 8: Reagenzien und Mengenangaben für Trenn- und Sammelgele.....	60
Tab. 9: Stromstärke [mA] für die Gelelektrophorese.....	61
Tab. 10: Reagenzien und Mengenangaben für Transblot-Puffer.....	62
Tab. 11: Reagenzien und Mengenangaben für TBS- und TBST-Puffer.....	62
Tab. 12: Antikörper für Western Blot und deren Verdünnung.....	63
Tab. 13: Altersverteilung des Probandenkollektivs	72
Tab. 14: Anthropometrische Kennzeichen und Körperzusammensetzung bei jüngeren und älteren Frauen sowie deren Mittelwertvergleiche	73
Tab. 15: Deskriptive Befunde zum Chronotyp nach D-MEQ-Fragebogen	74
Tab. 16: Schlafqualität und Tagesschläfrigkeit bei jüngeren und älteren Frauen sowie deren Mittelwertvergleiche.....	76
Tab. 17: Stress und Lebenszufriedenheit bei jüngeren und älteren Frauen sowie deren Mittelwertvergleiche.....	77
Tab. 18: Gesundheit und Ernährungsgewohnheiten bei jüngeren und älteren Frauen sowie deren Mittelwertvergleiche	80
Tab. 19: Zeiträume im Freien und körperliche Aktivität von jüngeren und älteren Frauen sowie deren Mittelwertvergleiche.....	82
Tab. 20: Körperkerntemperatur oral (° C) bei jüngeren und älteren Frauen sowie deren Mittelwertvergleiche.....	83
Tab. 21: Vergleich der Körperkerntemperaturdaten bei jüngeren und älteren Frauen mittels t-Test für verbundene Stichproben.....	85

Tab. 22: periphere Hauttemperatur am Fuß (° C) bei jüngeren und älteren Frauen sowie deren Mittelwertvergleiche	86
Tab. 23: Vergleich der Hauttemperaturdaten bei jüngeren und älteren Frauen mittels t-Test für verbundenen Stichproben und Wilcoxon-Test	87
Tab. 24: Circadiane Merkmale der peripheren Hauttemperatur bei jüngeren und älteren Frauen sowie deren Mittelwertvergleiche	88
Tab. 25: <i>hBmal1/h36B4</i> -Ratio (Gen) bei jüngeren und älteren Frauen sowie deren Mittelwertvergleiche.....	90
Tab. 26: Vergleich der <i>hBmal1</i> -Ratios bei jüngeren und älteren Frauen mittels t-Test für verbundenen Stichproben und Wilcoxon-Test	91
Tab. 27: <i>hSod1/h36B4</i> -Ratio (Gen) bei jüngeren und älteren Frauen sowie deren Mittelwertvergleiche.....	92
Tab. 28: Vergleich der <i>hSod1</i> -Ratios bei jüngeren und älteren Frauen mittels t-Test für verbundenen Stichproben und Wilcoxon-Test	93
Tab. 29: SOD1/ β -Aktin-Ratio (Protein) bei jüngeren und älteren Frauen sowie deren Mittelwertvergleiche.....	94
Tab. 30: Vergleich der SOD1-Proteinkonzentration bei jüngeren und älteren Frauen mittels Wilcoxon-Test.....	95
Tab. 31: Oxidativer Stress: 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosin (pg/mL) bei jüngeren und älteren Frauen sowie deren Mittelwertvergleiche	96
Tab. 32: Vergleich der oxidativen Stress-Konzentration bei jüngeren und älteren Frauen mittels t-Test für verbundenen Stichproben und Wilcoxon-Test.....	97
Tab. 33: Melatonin-Konzentration (pg/mL) bei jüngeren und älteren Frauen.....	98
Tab. 34: Vergleich der Melatonin-Konzentration bei jüngeren und älteren Frauen mittels Wilcoxon-Test.....	99
Tab. 35: Korrelationen in der Gesamtgruppe zwischen <i>hBmal1</i> -Gen und <i>hSod1</i> -Gen.....	100
Tab. 36: Korrelationen nach Altersgruppen zwischen <i>hBmal1</i> -Gen und <i>hSod1</i> -Gen	101
Tab. 37: Korrelationen in der Gesamtgruppe zwischen <i>hSod1</i> -Gen und SOD1-Protein.....	102
Tab. 38: Korrelationen in der Gesamtgruppe zwischen Melatoninkonzentration und <i>hBmal1</i> -Gen	106
Tab. 39: Korrelationen bei älteren Frauen zwischen Melatoninkonzentration und <i>hBmal1</i> -Gen	108

Tab. 40: Korrelationen bei jüngeren Frauen zwischen Melatoninkonzentration und *hBmal1*-
Gen 109

13 ANHANG

Alle Anhänge befinden sich auf dem beiliegenden elektronischen Datenträger. Nachfolgend sind die einzelnen Anhänge aufgeführt.

A1 Prätest-Fragebogen

A2 Probandeninformation über den Ablauf des Versuchs

A3 Schlaftagebuch (DGSM)

A4 Fragebogen – Allgemeine Daten

A5 Chronotyp – Horne-Östberg-Fragebogen (deutsche validierte Version, D-MEQ)

A6 Schlafqualitäts-Fragebogen Pittsburgh-Sleep-Quality-Index (PSQI)

A7 Tagesschläfrigkeits-Fragebogen Epworth Sleepiness Scale (ESS)

A8 Apnoe-Fragebogen

A9 Fragebogen – Lebenszufriedenheit

A10 Fragebogen – Stress (Perceived stress scale - PSS)

A11 Datenbogen

A12 Probandenprotokoll

A13 Datenbogen – iButton

A14 Gelbilder der Western Blots

A15 Tabellen zur Normalverteilung

A16 Tabellen für Korrelationen

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Prof. M. Dittmar herzlich für die Bereitstellung des Themas, der Materialien und Geräte sowie für die gute Betreuung während der Entstehung dieser Arbeit bedanken.

Ein Dank geht an Frau Prof. Dr. A. Klettner und ihre Kolleginnen für die Einarbeitung in die Methode des Western Blots sowie an Frau L. Schierloh für die Einarbeitung in die RNA-Analytik.

Dem Zentrum für Biochemie und Molekularbiologie der CAU danke ich für die kostenlose Bereitstellung des LightCyclers und Herrn Prof. Dr. H. Schulenburg für die Nutzungsmöglichkeit des Abzuges in seiner AG. Außerdem danke ich Frau Dr. K. Dierking für den Gerätezugang für die Chemilumineszenzaufnahmen.

Ein großes Dankeschön geht an die vielen freiwilligen Probandinnen, die an dieser Studie teilgenommen haben und die Arbeit dadurch erst möglich gemacht haben.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinen Kollegen Jana Rathje und Daniel Schütz bedanken für die vielen fachlichen und nicht-fachlichen Gespräche und das stets angenehme Arbeitsklima.

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit – abgesehen von der Betreuung durch Frau Prof. Dr. M. Dittmar – in Inhalt und Form meine eigene ist und von mir selbst verfasst wurde. Diese Dissertation ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis gemäß der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden. Außer den genannten Quellen und Hilfsmitteln wurden keine weiteren genutzt. Inhaltlich aus anderen Quellen entnommene Quellen wurden als solche gekennzeichnet.

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bis zum heutigen Tage weder an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel noch an einer anderen Institution in einem Promotionsverfahren befunden habe oder befinde oder ein Promotionsverfahren endgültig nicht bestanden habe. Ein akademischer Titel wurde mir nicht entzogen. Diese Arbeit wurde weder in Teilen noch in Ihrer Gänze an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Ein Teil dieser Arbeit wurde bereits im Rahmen eines Kongresses vorgestellt:

13. Internationaler Kongress der Gesellschaft für Anthropologie (GfA), 2019, Göttingen

Poster:

Daniela Töbelmann und Manuela Dittmar: Aging, stress and life satisfaction

Kiel, den 14.01.2020

Daniela Töbelmann