

Aus dem Institut für Medizinische Psychologie
der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Direktorin: Prof. Dr. Martha Merrow, PhD)

**Optimierung einer Methode für DNA-Isolierung aus Speichel und
Rückmeldkontrolle der anschließenden Onlinestudie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Magdalena Javorova Zaharieva

aus
Sofia, Bulgarien

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Till Roenneberg
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Katja Anslinger
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Karla Viviani Allebrandt, PhD
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	16.10.2013

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. DNA Isolierung.....	6
1.2 Speichelzusammensetzung.....	8
1.3 Zusammensetzung der oralen Mikroflora.....	10
1.4 Trennung der Bakterien von Epithelzellen.....	11
1.5 Eigenschaften und Restriktion der DNA.....	12
1.6 Faktoren für Quantität und Qualität der DNA.....	14
1.6.1 Totale DNA Konzentration.....	14
1.6.2 DNA Integrität.....	15
1.7 PCR und Amplifikation humanspezifischer DNA (hDNA).....	16
1.8 Genomweite Assoziationsstudie (GWAS).....	17
1.9 Chronotyp.....	18
1.10 MCTQ und MSFsasc.....	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Patientengut.....	20
2.1.1 Patientengut für den ersten Teil.....	20
2.1.2 Patientengut und Studienablauf des zweiten Teils.....	20
2.2 Methode 0 (Oragene® DNA Kit).....	22
2.3 Quantität der DNA.....	23
2.4 Qualität der DNA.....	24
2.4.1 DNA Primer und PCR Bedingungen.....	24
2.4.1.1 Kontrollen mit E.coli DNA und DNA von Blut.....	26
2.4.2 Gelelektrophorese.....	27
2.4.2.1 der PCR Produkte.....	27

2.4.2.2 der genomischen DNA.....	27
2.5 Optimierungsmethoden	28
2.5.1 Methode 1.....	30
2.5.1.1 Gram – Färbung.....	30
2.5.2 Methode 2.....	31
2.5.2.1 Filtration.....	31
2.5.2.2. Lyse.....	32
2.5.2.3. DNA Isolierung und DNA Qualitätskontrolle.....	33
2.5.3 Methode 3.....	33
2.5.4 Methode 4.....	34
2.5.5 Methode 5.....	34
2.6 Statistische Analyse.....	35
3. Ergebnisse.....	36
3.1 Prüfung der Methoden.....	36
3.1.1 Methode 1.....	36
3.1.2 DNA Quantität und DNA Reinheit.....	36
3.1.2.1 Methode 0.....	36
3.1.2.2 Methode 2.....	37
3.1.2.3 Methode 3.....	38
3.1.2.4 Methode 4.....	40
3.1.2.5 Methode 5.....	41
3.1.3 DNA Integrität.....	43
3.1.4 PCR Amplifikation von bakterieller DNA mit Primern für E.coli.....	44
3.1.5 PCR Amplifikation von humanspezifischer DNA (hDNA).....	45
3.2 Ergebnisse der Rückmeldkontrolle der Onlinestudie.....	47
3.2.1 Teilnahme.....	47

3.2.2 Speichelkits zurück.....	48
3.2.3 DNA Isolierung.....	48
4. Diskussion.....	50
4.1 Optimierungsmethoden.....	50
4.2 Rückmeldkontrolle.....	53
5. Zusammenfassung.....	56
6. Literaturverzeichnis.....	58
7. Anhang.....	63
7.1 Liste der Tabellen.....	63
7.2 Liste der Abbildungen.....	64
7.3 Materialliste.....	65
7.4 Einladung 1. Teil.....	67
7.5 Einladungen 2. Teil.....	71
7.5.1 Brief für Rekrutierung von Probanden für die epidemiologische Studie.....	71
7.5.2 Brief für Rekrutierung von Probanden für die GWAS	72
7.5.3 Aufklärungs- und Einwilligungsbrief an die Teilnehmer.....	75
7.6 Oragene® DNA Isolierungsprotokoll.....	79
7.7 DNA Extraktion aus EDTA Blut.....	81
7.8 Gram – Färbung.....	83
7.9 Ethikantrag.....	84
8. Danksagung.....	90

1. Einleitung

Die Genotypisierung des gesamten Genoms in epidemiologischen Studien erfordert die Untersuchung von DNA mit hoher Qualität, meistens gewonnen aus Blut. Viele Methoden ermöglichen die Gewinnung von genetischem Material ohne das persönliche Treffen mit den Probanden. Zusätzlich erhöhen einfache und nicht-invasive Techniken wie Speichelproben die Teilnahmebereitschaft. Für unsere Studie haben wir Probanden, die durch einen Online-Fragebogen für Schlafgewohnheiten bereits phänotypisiert wurden, DNA Speichelkits zugesandt. Hier berichten wir über die Ergebnisse von 6 Methoden für Isolierung von DNA aus Speichelproben, sowie über die Rückmeldung der Probanden.

1.1 DNA Isolierung

Die Genforschung beginnt mit der Sammlung von DNA Proben. Dabei ist es wichtig möglichst viele Proben zu untersuchen, um repräsentative Ergebnisse liefern zu können. Für Studien wird DNA häufig aus frischem venösem Blut oder aus Mundschleimhautzellen isoliert. Die DNA soll von guter Qualität und Quantität sein.

Das frische venöse Blut ist bezüglich dieser zwei Parameter eine hervorragende DNA Quelle. Die Blutentnahme erfordert jedoch einen schmerzhaften Eingriff (Venenpunktion) durch medizinisch ausgebildetes Fachpersonal, was die Kosten erhöht. Die Invasivität der Methode kann viele Probanden einschüchtern und dadurch die Teilnahmerate deutlich reduzieren. Die komplizierte Aufbewahrung und Logistik der Blutproben erschwert die Sammlung von DNA aus weiten geografischen Regionen. Alle diese Tatsachen machen in letzter Zeit alternative DNA Quellen für epidemiologische Studien üblich. In der Literatur sind verschiedene Methoden beschrieben, DNA aus der Mundhöhle zu gewinnen. Die Studie von Hansen et al. (2007) zeigte, dass nur 31% von den eingeladenen Probanden eine Blutprobe abgaben, während 72% eine Speichelprobe, 80% eine Zytobürstenprobe mit Mundschleimhautzellen

und 76% eine Probe auf FTA™ Karte mit Mundepithelzellen zurückschickten. Die DNA Isolierung aus bukkalen Epithelzellen ist eine immer häufiger benutzte Methode in epidemiologischen Studien.

Allgemein gibt es zwei Verfahren für die Sammlung von Mundschleimhautepithelien: „trocken“ und „nass“: die trockenen Verfahren benutzen Zytobürsten, Wattestäbchen oder andere Methoden, um Zellen von der oralen Schleimhaut abzuschaben (Saab et al., 2007). Die nassen Verfahren benutzen Mundspüllösungen oder selbst den Speichel, die dann in einem speziellen Behälter abgegeben werden. Nachteilig bei den nassen Verfahren sind die meistens alkoholhaltigen Mundspüllösungen, die ein brennendes Gefühl auf die Mundschleimhaut hervorrufen (Garcia-Closas et al., 2001).

Einige Studien haben gezeigt, dass die Mundspüllösungen - Verfahren einen hohen DNA Gehalt von guter Qualität liefern (Feigelson et al., 2001, Le Marchand et al., 2001, Heath et al., 2001). Andere Studien haben die Mundwasser - mit den Bürsten – Verfahren verglichen und haben gefunden, dass die ersten gegenüber den zweiten bzgl. der DNA Quantität überlegen sind (King et al., 2002).

Die isolierte DNA Menge variiert stark, abhängig von der entsprechenden Methode. Die mittlere DNA Menge, gewonnen mit Wattestäbchen, ist 1,9 µg (Cozier et al., 2004). Die Methode mit „Guthrie“ Karten liefert mittlere DNA Mengen von 2,3 µg (Harty et al., 2000). Mit Zytobürsten - und Mundwasser - Methode gewinnt man 6,8 µg (Garcia-Closas et al., 2001) bzw. 35,1µg (Le Marchand et al., 2001) DNA. Der mittlere DNA Gehalt mit der Oragene® Methode liegt bei 110 µg (DNA Genotek Bulletin). Zum Vergleich gewinnt man 30 µg DNA aus 1 ml Blut (Lench et al., 1988).

Das Oragene® Kit dient der „sicheren Entnahme von DNA – Proben aus Humanspeichel“ (DNA Genotek Inc.). Der Hersteller verspricht: nichtinvasive Methode zur Selbstentnahme

von Speichel, hohe Probandenteilnahmerate, Langzeitlagerung bei Raumtemperatur möglich, DNA Quantität vergleichbar mit der von Blut, kompaktes Design für den Postversand.

Im Vergleich zu anderen Methoden wie Mundwasserlösung und Zytobürstchen bietet das Oragene® Kit höhere DNA Qualität und Quantität, sowie Zuverlässigkeit für „downstream“ Anwendungen, niedrigeren Bakteriengehalt von 6,8 % im Vergleich zu bis zu 88,5 % bei anderen Methoden (DNA Genotek Inc., 2005).

Das Oragene® Kit ist der Blutentnahme wegen folgenden Aspekten überlegen: höhere Bereitschaft der Probanden zur Teilnahme wegen der schmerzlosen Selbstentnahme im Vergleich zu Blutentnahme, niedrigere Kosten, die Venenpunktion entfällt, sicheres Handhaben, niedriges Infektionsrisiko, einfache DNA Isolierung (DNA Genotek Inc.).

Ein wesentlicher Nachteil sowie der Oragene® als auch allen anderen Methoden zur Gewinnung von DNA aus Speichel ist die Kontamination mit bakterieller DNA. So enthält die isolierte genomische DNA auch die Erbinformation von Bakterien. Für die kostspieligen genomweiten Analysen muss die humane DNA Konzentration sehr präzise sein, eine Kontaminierung mit fremder DNA kann zu großen materiellen Verlusten führen.

1.2 Speichelzusammensetzung

Der Speichel ist ein Gemisch der Sekrete der großen und kleinen Speicheldrüsen und besteht zu 99% aus Wasser. Neben seinen Aufgaben zur Befeuchtung und Verdauung hat der Speichel auch antibakterielle Eigenschaften (enthält Lysozym) und beschleunigt die Blutgerinnung. Ferner findet man im Speichel in Spuren eine Vielzahl von Stoffen, z.B. Proteine, Aminosäuren, Vitamine, Hormone, Immunglobuline und Enzyme sowie blutgruppenspezifische Substanzen. An Ionen sind unter anderem Kalzium, Natrium, Kalium,

Eisen, Phosphat, Chlor und Fluorid enthalten. Der pH des Speichels liegt im schwach sauren Bereich bei 6,7-6,8 (Lehmann, 1998).

Auch zelluläre Elemente sind im Speichel enthalten. Es handelt sich dabei sowohl um desquamierte Epithelzellen der Mundschleimhaut (Abb. 1), als auch um Leukozyten und gelegentlich um Erythrozyten (Lehmann, 1998). Die kernhaltigen Zellen sind die Quelle der DNA.

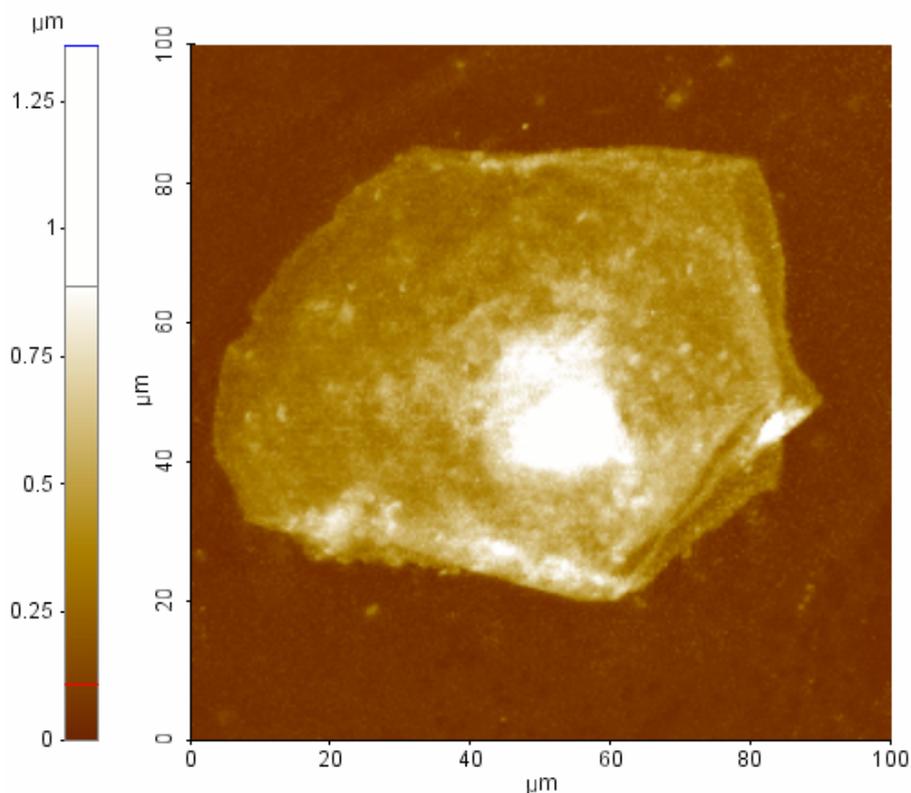


Abb. 1. Menschliche Epithelzelle aus der Wangenschleimhaut (Quelle: Park Systems Corp., KANC 4F, Iui-Dong, 906-10 Suwon 443-270, Korea).

Weiterhin findet man im Speichel zahlreiche Mikroorganismen, die in einer bunten Mischflora vorkommen. Das Sekret der Speicheldrüsen wird steril sezerniert und bietet den Mikroorganismen der Mundhöhle gute Lebensbedingungen (Lehmann, 1998).

1.3 Zusammensetzung der oralen Mikroflora

Der Keimgehalt des Speichels ist außerordentlich hoch. So konnte man bisher ca. 300 verschiedene Arten von Mikroorganismen aus der menschlichen Mundhöhle isolieren (Keller, 1994). Dabei handelt es sich um aerobe, fakultativ anaerobe und obligat anaerobe Bakterien, Viren, Protozoen und Pilze (Bräunig, 2003). Die Bakterien repräsentieren dabei einen besonders hohen Anteil der oralen Flora, zu dem vor allem die Streptokokken mit 30 – 60% gehören (Bräunig, 2003). Als häufigster Streptokokkus bei gesunden Mundverhältnissen zeigt sich der *S. salivarius* (Kang et al., 2006). Andere häufige Vertreter der oralen Mikroflora sind *Prevotella* und *Veillonella* (Kang et al., 2006).

Es gibt allerdings kaum eine Keimart, welche nicht gelegentlich in der Mundhöhle angetroffen werden kann (Berger, 1955). Die orale Mikroflora variiert in Abhängigkeit von der oralen Gesundheit des Menschen.

Studien haben gezeigt, dass der mittlere Gehalt an bakterieller DNA in den isolierten Proben 66,0% (Feigelson et al., 2001) und 50,5% mit dem Mundwasser- bzw. 88,5% mit dem Bürstenverfahren (Garcia-Closas et al., 2001) ist. Verglichen mit diesen Methoden zeigt die Oragene® Methode mit 6,8% den niedrigsten Gehalt an bakterieller DNA (Chartier et al., DNA Genotek Bulletin, 2005).

Um die bakterielle Kontaminierung zu verringern, haben wir einige Optimierungsmethoden entwickelt und dann die Ergebnisse mit der Null-Methode (Oragene®DNA) verglichen.

Die zusätzlichen Verfahren umfassten Dichtegradientenzentrifugation, Filtrierung, Behandlung mit dem Enzym DPN1 oder Chloroform, sowie Kombinationen.

1.4 Trennung der Bakterien von Epithelzellen

Eine häufig in Studien benutzte Methode zur Trennung der Bakterien von menschlichen Epithelzellen ist die Percoll Methode (Tylewska S. et al., 1987, Childs et al., 1988, Colombo et al., 2006). Das Percoll-Medium ist ein Kieselgel-Kolloid und wurde erstmals 1977 vorgestellt. Percoll besteht aus sehr kleinen Siliziumpartikeln mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 21-22 nm, die mit einer dünnen Schicht aus Polyvinylpyrrolidon überzogen sind, und wird als 23%iges kolloidales Gel angeboten (Steinbüchel, 2003). Es ist das Medium der Wahl für Separation von Zellen, Organellen, Viren und anderen subzellulären Bestandteilen. Percoll ist besonders hilfreich als erster Schritt zur Anreicherung von Zellen oder Zellbestandteilen vor weiterer Behandlung wie z.B. DNA- Isolierung (Handbuch Percoll, 2002).

Das Prinzip, das bei Percoll benutzt wird, ist die Dichtegradientenzentrifugation. Wenn eine Suspension von Partikeln mit verschiedener Größe zentrifugiert wird, ist die Sedimentationsrate proportional zu der Zentrifugalkraft. Außerdem, bei fixierter Kraft, ist die Sedimentationsrate proportional zu der Größe der Partikel und zu der Differenz zwischen der Dichte der Partikel und der Dichte des Umgebungsmediums. Wegen der spezifischen Dichte ist nach der Zentrifugation ein Verteilen der Epithelzellen näher an der Oberfläche und der Bakterien näher an dem Boden zu erwarten (Childs et al., 1988).

Um die Bakterien sichtbar zu machen, wurden sie in unserer Studie mit Gram-Färbung gefärbt.

Bakterien haben eine Zellwand, die aus Peptidoglykanen und Lipiden besteht. Gramnegative Bakterien haben eine dünnere Zellwand mit weniger Peptidoglykanen und mehr Lipiden. Die Kristallviolettfarbe ist eine sog. Basisfarbe, die die Zellwände färbt. Die Zugabe von Iodine Lösung fixiert die Kristallviolettfarbe, wobei beide ein Komplex bilden. Die Behandlung mit

Ethanol ist notwendig, um die Lipide von der Zellwand der gramnegativen Bakterien herauszulösen. Auf diese Weise geht das Farbkomplex in die Lösung und die dünnen Zellwände werden entfärbt. Im Gegensatz dazu schrumpft die Zellwand von den grampositiven Bakterien nach der Behandlung mit Ethanol, ihre Poren werden geschlossen und die Farbkomplexe können nicht in die Lösung diffundieren. So bleiben die grampositiven Bakterien dunkelblau gefärbt. Um auch die gramnegativen Bakterien sichtbar zu machen, benutzt man nach der Entfärbung eine Fuchsin Lösung, die diese Bakterien rot färbt (Produktinformation „77730 Gram Staining Kit“, Fluka).

1.5 Eigenschaften und Restriktion der DNA

Sowohl die prokaryontische als auch die eukaryontische DNA sind methyliert. Diese Methylierung dient dem Schutz der Zelle vor fremder DNA. Spezifische Enzyme übertragen Methylgruppen auf Adenin, das zum 6-Methyladenin wird, und auf Cytosin, das zum 5-Methylcytosin wird. Methylierungssequenz bei Prokaryonten ist GATC, wobei hier an das Adenin eine Methylgruppe angehängt wird (Hirsch – Kauffmann, 2000). So entsteht ein Methylierungsmuster der DNA, und Fremd- DNA, die dieses Muster nicht trägt, wird durch Enzyme abgebaut.

Das Enzym DPN1 ist eine Restriktionsendonuklease. Sie wird von dem Bakterium *Diplococcus pneumoniae* gewonnen und spaltet spezifisch die DNA Sequenz –GmATC– (Abb.2) (Nelson et al., 1993).

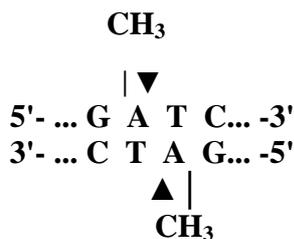


Abb. 2. Restriktion von prokaryontischer DNA durch das Enzym DPN1.

Das Enzym DPN1 spaltet die DNA von *E. coli* zu Fragmenten, die ein Molekulargewicht von ca. halbem Million Dalton haben (Lacks et al., 1975). Das mittlere Molekulargewicht von einem DNA - Basenpaar beträgt 650 Dalton (Internetreferenz 1), d.h. dass die DNA - Bruchstücke nach einer Behandlung mit dem DPN1 Enzym eine Größe von ca. 770 bp haben. Das Enzym verdaut allerdings nur die methylierte DNA.

Die DNA von Säugetieren ist auch methyliert, wobei aber bei ihnen einen anderen Methylierungsmuster besteht. Etwa 2-7 % der Cytosine einer Zelle sind methyliert. Meist sind es die Cytosine aus den 5'-CpG-3' Dinukleotiden, die auf beiden komplementären DNA-Strängen eine Methylgruppe tragen (Abb.3). Die Mehrheit (etwa 60-90%) aller CpGs des Säugetiergenoms sind methyliert, wobei die restlichen, unmethylierten CpG-Dinukleotide vorwiegend innerhalb den CpG-Inseln, DNA - Regionen mit erhöhter CpG-Dinukleotid-Dichte, anzutreffen sind (Internetreferenz 2).

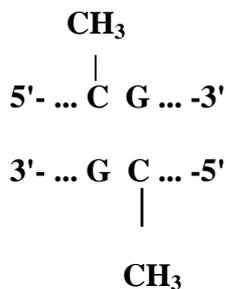


Abb. 3. Methylierungsmuster von eukaryontischer DNA.

Wegen dem unterschiedlichen Methylierungsmuster in eukaryontischen Zellen können nur wenige Restriktionsendonukleasen (z.B. *mcrA*), zu denen DPN1 nicht gehört, die menschliche DNA spalten (Burkhart et al., 1992).

1.6 Faktoren für Quantität und Qualität der DNA

1.6.1 Totale DNA Konzentration

Der Hersteller des Oragene® Kits (DNA Genotek Inc.) empfiehlt, dass die Quantifizierung der DNA mit Fluoreszenzspektroskopie mit SYBR Green I oder PicoGreen (Molecular Probes) erfolgt. Die Vorteile dieser Methode liegen in der gezielten Messung nur der doppelsträngigen DNA (dsDNA) und nicht der RNA, die mitisoliert wurde (DNA Genotek, 2011). Diese Methode ist aber sehr teuer und zeitraubend.

Eine andere gute und übliche Methode zur Messung der DNA – Konzentration in verschiedenen Proben, die auch genaue Ergebnisse liefert, ist die UV/Vis-Spektralphotometrie. Die nutzt die elektromagnetischen Wellen des ultravioletten (UV) und des sichtbaren (englisch: visible, Vis) Lichts und misst die Absorption der Probe bei verschiedenen Wellenlängen.

Das Gerät misst die DNA – Konzentration (in ng/μl). Als Ergebnis bekommt man eine Kurve. Auf deren x – Achse wird die Wellenlänge in nm und auf der y – Achse die Absorption angezeigt. Nukleotide und RNA absorbieren das Licht nur bei einer Wellenlänge von 260 nm (NanoDrop Technical Support Bulletin, 2007). Die Absorption bei 260 nm (A₂₆₀) sollte zwischen 0,1 und 1,5 sein. Bei 230 nm absorbieren Kohlenhydrate, Phenole, Peptide und aromatische Gruppen (Internet Referenz 3). Die Absorption bei 320 nm Wellenlänge zeigt die Resttrübung in der Probe (z.B. Nahrungspartikel). Damit erhöht ein hoher Wert von A₃₂₀ den A₂₆₀-Wert, mindert aber den A₂₆₀/A₂₈₀ Quotienten. Viele Geräte subtrahieren automatisch den A₃₂₀-Wert von den A₂₆₀- und A₂₈₀-Werten und liefern damit den „korrekten“ Quotienten. Stoffe wie Chloroform beseitigen fast alle Unreinheiten, die das Licht bei 320 nm absorbieren und verbessern damit auch den A₂₆₀/A₂₈₀ Quotienten, ohne die Qualität bzw. die Integrität der DNA negativ zu beeinflussen (Iwasiow et al., 2006).

Das dazugehörige Softwareprogramm liefert auch die A260/A280 und A260/A230 Quotienten (sog. „ratios“). Ein A260/A280 Quotient dient als Maß für die „Reinheit“ der DNA und sollte ca. 1,8 sein. Der A260/A230 Quotient sollte etwa 2,2 sein (Internetreferenz 3).

1.6.2 DNA Integrität

Die Qualität der isolierten genomischen DNA kann mithilfe der Agarose - Gelelektrophorese auf ihre Unversehrtheit geprüft werden. DNA mit einem hohen (> 23 kb) Molekulargewicht ohne Verschmierung weist auf keine (geringe) Degradierung und auf eine gute Qualität der DNA hin (Garcia-Closas et al., 2001, Anekella et al., 2008).

Die Gelelektrophorese ist eine einfache und sehr effektive Methode zur Trennung, Identifizierung und Klärung von DNA Fragmenten (0,5 – 25 kb) (Voytas D., 2001).

Aufgrund der negativen Ladung der DNA wandern die Nukleinsäure-Stränge in dem angelegten elektrischen Feld zu dem positiven Pol. Dabei wandern kürzere DNA Moleküle schneller durch die Poren der Agarosegelmatrix als längere. Je konzentrierter der Agarosegel ist, desto kleiner sind die Poren, dementsprechend benutzt man höhere Gel- Konzentrationen für PCR Amplifikate und niedrigere Konzentrationen für genomische DNA (Garcia-Closas et al., 2001). Die Visualisierung der DNA erfolgt durch Ethidiumbromid, das an die Nukleotidstränge bindet und sie bei Anregung mit ultraviolettem Licht durch Fluoreszenz sichtbar macht.

Die Länge der DNA Moleküle kann bestimmt werden durch einen Vergleich mit einer DNA-Leiter, die DNA-Fragmente bekannter Größe enthält und parallel zur Probe im Gel mitläuft.

1.7 PCR und Amplifikation humanspezifischer DNA (hDNA)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine enzymatische in-vitro Reaktion, bei der spezifische DNA Abschnitte vermehrt werden (Amplifikation) (Templeton, 1992). Dazu wird ein Enzym verwendet, die DNA- Polymerase. Sie katalysiert die Synthese von DNA aus Desoxyribonukleotiden an einer DNA-Matraxe. Heutzutage gibt es auf dem Markt mehrere thermostabile DNA – Polymerasen. Die Polymerase in unserer Studie (Taq Polymerase), wird von dem Bakterium *Thermus aquaticus* produziert.

Zu den anderen notwendigen Komponenten für die PCR zählen unter anderem DNA, große Mengen an den vier dNTPs (Desoxynukleotidtriphosphat) und Primer-Sequenzen.

Primer sind Oligonucleotidsequenzen, die an spezifischer Stelle mit der DNA- Schablone binden und so die Bildung gezielter PCR - Produkte ermöglichen. Jeder von den Primern bindet an einem DNA – Einzelstrang, die Primer-Sequenz wird von der DNA – Polymerase verlängert bis die spezifische DNA – Sequenz synthetisiert wird (Templeton, 1992).

Die DNA – Polymerase braucht eine spezielle Pufferlösung, die die optimale chemische Umgebung sicherstellt. Die Pufferlösung enthält KCL, Tris-HCL und MgCl₂. Die Mg- Ionen dienen als Kofaktor für die DNA- Polymerase und sind sehr wichtig für die Reaktion: wenn die Mg-Ionenkonzentration zu gering ist, dann findet keine Amplifikation statt. Wenn die Konzentration zu hoch ist, dann findet eine nicht spezifische Amplifikation statt (Templeton, 1992).

Die eigentliche Reaktion findet in einem Thermocycler statt und startet mit der Denaturierung des DNA- Doppelstranges und der Primer bei etwa 94-96°C. Dann liegen sie als Einzelstränge vor. In einem zweiten Schritt wird die Temperatur bis 37-57°C gesenkt, was den Primern erlaubt an die spezifischen DNA – Sequenzen zu binden. Der letzte Schritt ist die

DNA – Extension bei etwa 68-72°C, abhängig von der verwendeten DNA – Polymerase. Das Enzym füllt die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf. Die Polymerase beginnt am 3'-Ende des angelagerten Primers und folgt dann dem DNA-Strang (Internetreferenz 4). So liegen am Ende des Prozesses viele gleiche spezifische DNA Sequenzen (Amplifikate) vor.

Studien haben gezeigt, dass die humanspezifische DNA von Proben aus der Mundhöhle wegen der bakteriellen Kontaminierung ein kleinerer Teil von der Gesamt - DNA ist. So stellen Feigelson et al. (2001) fest, dass der mittlere Gehalt humanspezifischer DNA 34% ist. Eine andere Studie (Garcia-Closas et al., 2001) ergibt für den Gehalt humanspezifischer DNA Werte von 49,5 % für Mundwasser- und 11,5 % für Zytobürsten- Methode.

Erfolgreiche Amplifikation des β - Globin Gens in Studien zeigt, dass die mit Oragene® Kit isolierte DNA intakt ist und keine Inhibitoren enthält, die die Amplifikation beeinträchtigen können (Anekella et al., 2008). Soeben haben Rylander - Rudqvist et al. (2006) gezeigt, dass die DNA vom Oragene® Kit gut geeignet ist für Amplifikation des gesamten Genoms (WGA, engl. whole genome amplification).

1.8 Genomweite Assoziationsstudie (GWAS)

Eine genomweite Assoziationsstudie (GWAS, engl. genome-wide association study) ist eine Untersuchung der Assoziation von genetischen Variationen des menschlichen Genoms mit einem bestimmten Merkmal, dem Phänotyp, z.B. Schlafdauer (Allebrandt et al., 2011). Die Untersuchung des Genoms vieler Probanden und die Identifizierung von genetischen Assoziationen erlauben den Forschern, neue Informationen z.B. über die Diagnose, Therapie und Vorbeugung der Krankheit zu gewinnen.

1.9 Chronotyp

Menschen können anhand von ihrem Schlafverhalten in verschiedenen Chronotypen klassifiziert werden. Manche, die alleine früh aufstehen, sind sehr aktiv in dem ersten Teil des Tages und schlafen früh ein (Roenneberg et al., 2007). Die sind dementsprechend Frühtypen oder auch Lerchen genannt. Im Gegensatz dazu nennt man Spättypen oder Eulen Menschen, die bis spät am Tag schlafen, leistungsfähiger am Nachmittag sind und spät in der Nacht einschlafen. Natürlich befinden sich viele Menschen „dazwischen“ und haben ein „normales“ Schlafverhalten (Abb. 4). Die beiden extremen Typen unterscheiden sich nicht nur in den Schlafzeiten, sondern auch in wie ihre Körperfunktionen (z. B. Körpertemperatur, Blutdruck, Melatoninsekretion, Aufmerksamkeit usw.) im Laufe des Tages variieren (Kerkhof, 1985, Dunlap et al., 2004, Kanazawa et al., 2009).

Unsere Schlafzeiten werden von zwei „Uhren“ kontrolliert: von der inneren, biologischen Uhr, die bestimmt, wann wir bereit sind zu schlafen oder aufzustehen, und von der äußeren, sozialen Uhr (z.B. dem Wecker). Tierversuche und Untersuchungen am Menschen zeigen, dass das Schlafverhalten von Genen beeinflusst wird (Allebrandt et al., 2008). Die Steuerung der inneren Uhr ist also eine angeborene Eigenschaft und deshalb individuell bei jedem Menschen.

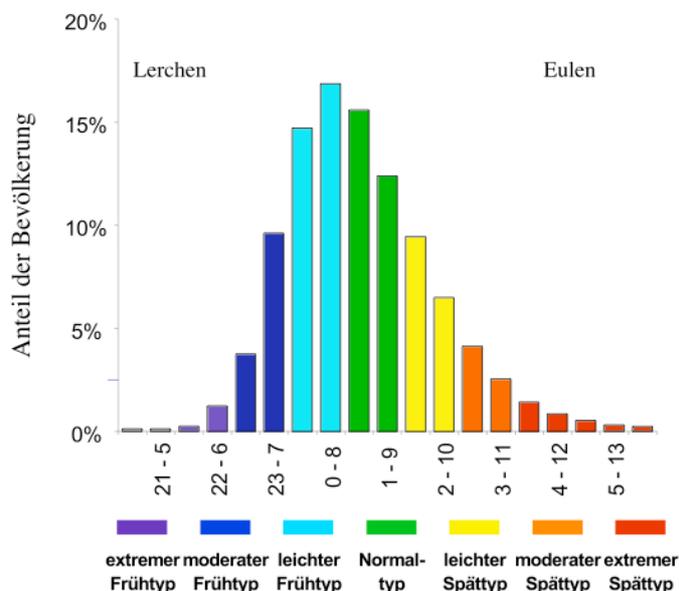


Abb. 4. MSF und Verteilung der Chronotypen in der deutschen Bevölkerung (Quelle: Till Roenneberg, persönliche Kommunikation)

Beim Chronotyp handelt es sich um eine Eigenschaft deren Relevanz von der medizinischen Diagnostik und Therapie bis zur Planung von Schichtarbeit und zum Design wissenschaftlicher Studien reicht. In Tierversuchen und Untersuchungen am Menschen wurde gezeigt, dass der Chronotyp stark von genetischen Faktoren beeinflusst wird. Mutationen und Polymorphismen in allen bisher bekannten Uhrengenen bestimmen den Chronotyp des Individuums (Toh et al., 2001; Xu et al., 2005).

1.10 MCTQ und MSFsasc

Um den Chronotyp des Probanden festzustellen, entwickelten Roenneberg et al. (2003) den Fragebogen Munich Chronotype Questionnaire (MCTQ) (Internetreferenz 7). Dort werden Informationen über Schlafzeiten an freien und an Arbeitstagen abgefragt. Daraus lässt sich der „mittlere Schlaf“ berechnen: der ist die Mitte zwischen Einschlafen und Aufwachen, z.B. schläft man um 00:00 h ein und wacht um 8:00h, so ist der „mittlere Schlaf“ um 4:00h. Der „mittlere Schlaf“ an freien Tagen (MSF, engl. mid sleep on free days) ist der Maß für den Chronotyp (Abb. 4). MSFsasc ist der korrigierte Wert in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht (Roenneberg T., Merrow M., 2003, Roenneberg et al., 2003).

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines größeren Projektes, welches in einer genomweiten Analyse die Assoziation zwischen dem Genotyp (DNA von Speichelproben) und dem Phänotyp von den Personen, die in einer ursprünglichen Studie als extremer Chronotyp identifiziert wurden, untersucht. Ziel der genomweiten Analyse ist es, sowohl die aus Tierversuchen bekannten Uhrengene beim Menschen zu verifizieren, als auch neue Uhrengene mit Hilfe der inneren Uhr des Menschen zu identifizieren.

2. Material und Methoden

2.1 Patientengut

2.1.1 Patientengut für den ersten Teil

Für den ersten Teil der Studie (Optimierung der DNA Isolierung) haben wir 13 Personen (alle waren Mitarbeiter am Institut für medizinische Psychologie) gebeten, ihre Speichelprobe für unsere Studie abzugeben. Alle Probanden haben Teilnehmerinformationsblätter bekommen (s. Anhang „Einladung 1. Teil“) und haben ihre Einverständniserklärung gegeben. Für die Studie wurde der Ethikantrag Projekt-Nr. 170-08 von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt. Die Probanden waren zwischen 22 und 39 Jahre alt und unterschiedlicher Herkunft. Von allen 13 Speichelproben haben wir die DNA isoliert und sie durch die Optimierungsmethoden durchlaufen lassen.

Für Kontrollexperimente wurden auch zwei Blutproben benutzt. Sie gehörten zweier Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe und wurden von dem Betriebsarzt am Institut für medizinische Psychologie durch Venenpunktion gewonnen.

2.1.2 Patientengut und Studienablauf des zweiten Teils

Für den zweiten Teil der Studie (Rückmeldkontrolle der anschließenden Onlinestudie) wurden 5620 Personen von der Datenbank mit 70 000 bereits chronotypisierten Personen (Roenneberg et al., 2007) eingeladen den Online Fragebogen Munich Chronotype Questionnaire (MCTQ), den sie vor bis zu vier Jahren ausgefüllt haben, erneut auszufüllen.

Für die Studie wurde der Ethikantrag Projekt-Nr. 170-08 von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt (s. Anhang). Ziel der Fragebogenaktion war es, einen repräsentativen Querschnitt der Bevölkerung bezüglich des Chronotyps und der Schlafgewohnheiten an Arbeitstagen und freien Tagen zu erhalten. Der Fragebogen sollte daher von möglichst vielen Menschen (unterschiedlichen Alters,

verschiedener Berufe, verschiedener kultureller Hintergründe usw.) freiwillig beantwortet werden.

Die 5620 Probanden wurden auf ihre Email-Adressen mit einem Brief eingeladen (s. Anhang: Brief für Rekrutierung von Probanden für die epidemiologische Studie). Diese 5620 Personen wurden aufgrund ihres extremen Chronotyps ausgewählt. Sie gehörten entweder dem Früh- ($MSF_{sasc} \leq 3,6$ h) bzw. dem Spättyp ($MSF_{sasc} \geq 5,0$ h) (Abb.4). Die Probanden waren im Alter von 18 bis 55 und mit deutscher Abstammung.

Von allen Probanden, die den aktuellen Fragebogen neu ausgefüllt haben, wurden erneut 715 Extreme selektiert, die mit einem zweiten Email eingeladen wurden (s. Anhang: Brief für Rekrutierung von Probanden für die GWAS). Die Probanden wurden ausführlich über Nutzen, Ablauf und Datenschutz der Studie aufgeklärt und, falls sie ihr Einverständnis erklärt haben, wurden sie um ihre Adresse und um eine Probe ihres Speichels gebeten. Die Probanden hatten die Möglichkeit, ihre Teilnahme an der Studie zu verweigern, in dem sie ein Email mit dem Inhalt „Ich möchte NICHT teilnehmen“ an uns zurückschicken.

Den Personen, die zugesagt und eine Adresse angegeben haben, wurde dann ein Paket mit einem Oragene® Speichelkit, dem ein Brief beigelegt war, zugesandt (s. Anhang: Aufklärungs- und Einwilligungsbrief an die Teilnehmer). Die Teilnehmer wurden gebeten, je ein Exemplar der Informationsbestätigung und der Einverständniserklärung zu unterschreiben und die unterschriebenen Dokumente, zusammen mit ihrer Speichelprobe (entsprechend der Gebrauchsanweisung des Behälters) in dem von uns beigelegten Freiumschlag, zurückzusenden. Die Probanden hatten auch hier die Möglichkeit die Teilnahme ohne Gründe abzusagen, in dem sie an der dafür bestimmten Stelle des Briefes unterschreiben.

Zum Einhalten der Vorschriften zum Datenschutz, wurde jede Speichelprobe, sobald sie am Institut für medizinische Psychologie (IMP) eingetroffen war, kodiert. Somit konnte sie nur noch anhand eines drei- bzw. vierstelligen Codes identifiziert werden. Das Erbgut aus den Epithelzellen im Speichel wurde im Zeitraum April 2009 – November 2010 am Institut für

medizinische Psychologie in München isoliert. Diese Daten wurden ebenfalls kodiert und mit den Daten des zugehörigen, kodierten Fragebogens verknüpft. Eine endgültige Anonymisierung der Daten fand nach dieser Verknüpfung der Fragebogendaten mit den jeweiligen Erbgutdaten statt. Bei der darauf folgenden genetischen Analyse lagen dann nur noch die anonymen Codes zu den Daten vor. Das heißt, weder der Name, noch die Initialen, das Geburtsdatum, oder sonstige Angaben, die auf Teilnehmerperson Rückschlüsse zulassen könnten, könnten bei der Auswertung oder bei einer Veröffentlichung der Studienergebnisse zugeordnet werden.

2.2 Methode 0 (Oragene® DNA Kit)

Jeder Oragene® Entnahmebehälter enthält 2 ml Oragene-Flüssigkeit (der Inhalt wird nicht im Beipackzettel beschrieben). Laut Hersteller kann das Kit nach der Speichelspende bei Raumtemperatur (15-30°C) gelagert werden. Alternativ dazu kann man es auch bei Temperaturen von -15°C bis -20°C lagern. Die Speichel/Oragene Flüssigkeit kann mehrmals aufgetaut und gefroren werden.

Das Kit wird vom Hersteller in drei Formen angeboten (Scheibe, Tube und Kolben), wobei wir uns für den Scheibchen-Format wegen des besser möglichen Postversands entschieden haben.

Jeder Proband musste ca. 4 ml Speichel in den Behälter abgeben, wobei sich beim Verschließen des Deckels die Oragene Flüssigkeit entleert und sich mit dem Speichel mischt.

Laut Hersteller (DNA Genotek Inc.) sollte die Speichelabgabe folgendermaßen stattfinden:

Vor Verwendung muss die Oragene- Lösung im Entnahmebehälter klar und farblos sein. Die Probanden sollen 30 Minuten vor der Abgabe der Speichelprobe Essen, Trinken, Rauchen und Kaugummikauen einstellen. Vor der Speichelabgabe soll der Mund mit Wasser ausgespült

werden, um Speisereste zu entfernen. Anschließend soll mindestens 30 Sekunden mit der Speichelabgabe abgewartet werden.

Dann sollte so viel Speichel abgegeben werden, dass die Menge an flüssigem Speichel den angegebenen Füllstand erreicht oder überschreitet. Danach soll die Kappe mit der Oragene-Flüssigkeit auf den Behälter geschraubt und mindestens 10 Sekunden lang vorsichtig geschwenkt werden. Sobald der Speichel mit der Oragene-Lösung gemischt ist, sind die Zellen im Speichel sofort stabilisiert. So kann die Speichelprobe bei Raumtemperatur gelagert werden.

Einigen Menschen fällt die Abgabe großer Speichelmengen schwer. Die Speichelabgabe wird erleichtert, wenn man einen Teelöffel reinen weißen Zucker auf die Zunge gibt. Die Speichelabgabe sollte innerhalb von 30 Minuten abgeschlossen sein.

Nach Erhalt der Speichelproben wurden sie vor der manuellen Reinigung im Labor für 1 bis 6 Monate bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Bei der DNA Isolierung wurde das übliche Isolierungsprotokoll angewendet (s. Anhang: Oragene® Isolierungsprotokoll).

2.3 Quantität der DNA

Alle Proben wurden nach der DNA Isolierung mit dem Spektrophotometer NanoDrop 1000 (ND-1000, NanoDrop products, Wilmington, USA) analysiert.

Bevor wir die DNA Konzentration gemessen haben, wurden die Reaktionsgefäße für eine Stunde am Rüttler gemischt und dann bei 3000 rpm und Raumtemperatur für 30 Sekunden zentrifugiert. Vor der Messung der Proben fand immer ein Einstellen des Gerätes mit doppeldestilliertem Wasser und dann eine Messung der Absorption des TE-Puffers (sog. „blank“) statt. Die Messung wurde mit 1,5 µl von jeder Probe durchgeführt. Alle Messungen wurden automatisch in einer Tabelle gespeichert und in unsere Datenbank übertragen. Das

Softwareprogramm zu dem NanoDrop 1000 Gerät, das wir benutzt haben, subtrahiert nicht die A320-Werte von den A260- und A280-Werte.

2.4 Qualität der DNA

2.4.1 DNA Primer und PCR Bedingungen

Primer β - Globin 1 und Primer β - Globin 2 binden an beiden Seiten der DNA – Stränge, die den β - Globin - Gen mit einer Länge von 268 bp kodieren. β – Globin ist ein Bestandteil des Hämoglobins im menschlichen Blut und damit spezifisch für Menschen.

Verwendet man diese Primer in einer PCR Reaktion, kann man feststellen, ob die Proben humanspezifische DNA enthalten. Wurde also von einer Probe mit diesen Primern amplifiziert, kann man davon ausgehen, dass menschliche DNA vorhanden war, weil die Bakterien kein β – Globin haben.

Primer Ecoli 1 und Primer Ecoli 2 binden an beiden Seiten der DNA – Stränge, die den 16S rRNA - Gen mit einer Länge von 193 bp kodieren. Diese 16S rRNA bildet zusammen mit verschiedenen Proteinen die kleine 30S-Untereinheit der prokaryontischen Ribosomen. Sie ist damit spezifisch für ein weites Spektrum von Bakterien und ist nicht in menschlichen Zellen zu finden, weil Menschen keine solche rRNA besitzen (Muyzer et al., 1992).

Verwendet man diese Primer in einer PCR Reaktion, kann man feststellen, ob die Proben bakterielle DNA enthalten. Wurde also von einer Probe mit diesen Primern amplifiziert, kann man davon ausgehen, dass bakterielle DNA vorhanden war. Mithilfe der Messung der bakteriellen DNA vor und nach der durchgeführten Optimierungsmethode konnte festgestellt werden, ob die Methode effektiv war und ob sich der Bakteriengehalt verringert hat.

	Primer Sequenz	Primer Referenz
Primer β - Globin 1	5'-CAACTTCATCCACGTTACC-3'	Garcia – Closas et al., (2001)
Primer β - Globin 2	5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'	Garcia – Closas et al., (2001)
Primer Ecoli 1	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'	Muyzer et al., (1992)
Primer Ecoli 2	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'	Muyzer et al., (1992)

Die Primer (s. oben) wurden vom Hersteller (Metabion international AG) in Form von gefriergetrocknetem Pulver geliefert. Im Protokoll wurde auch die Menge doppeldestilliertes Wasser angegeben, in der die Primer gelöst werden sollten, um Konzentrationen von 100 pmol/ μ l zu erreichen. Für eine Konzentration von 5 pmol/ μ l, die für die PCR Reaktion nötig war, wurden die Primer nochmal mit doppeldestilliertem Wasser verdünnt.

Die Primer wurden folgendermaßen für die PCR vorbereitet:

- Zentrifugieren der Röhren für 5 Sekunden, um Pulver zu verdichten
- Auflösen des Pulvers in doppeldestilliertem Wasser, um auf Konzentrationen von 100 pmol/ μ mol zu kommen (laut Hersteller):

Primer Ecoli 1: 393 μ l

Primer Ecoli 2: 427 μ l

Primer β – Globin 1: 335 μ l

Primer β – Globin 2: 289 μ l

- Vermischen am Rüttler für einige Sekunden
- Verdünnung mit doppeldestilliertem Wasser, um auf Konzentrationen von 5 pmol/ μ l zu kommen. Dabei wurden 10 μ l von der Primerlösung mit 190 μ l doppeldestilliertem Wasser vermischt.

Unser PCR Protokoll basierte auf die modifizierten Protokolle von den Studien von Garcia-Closas et al., 2001, Muyzer et al., 1993 und Michelle et al., 2000.

Reagenz	Menge	Menge. in der neuen Lösung
1. dd H ₂ O	18 µl	
2. dNTP mix (10mM)	2 µl	
3. Mg ₂ Cl (25 mM)	4 µl	
4. Taq Puffer (10x)	5 µl	
5. Upstream Primer (5 pmol/µl)	10 µl	50 pmol
6. Downstream Primer (5 pmol/µl)	10 µl	50 pmol
7. DNA Probe	0,5 µl	
8. Red Hot [®] DNA Polymerase (5 units/µl)	0,5 µl	2,5 units
Endvolumen:		50 µl

Programm

- 94 °C / 90 Sek. (DNA-Denaturierung)
- 94°C / 1 Min.
- 57°C / 1 Min. → 30 Zyklen
- 72°C / 2 Min.
- 72°C / 10 Min. (DNA-Extension)

Als Kontrolle diente immer ein Behälter ohne DNA Zugabe.

2.4.1.1 Kontrollen mit E.coli DNA und DNA von Blut

Zur Kontrolle benutzten wir gereinigte bakterielle DNA von E. Coli (bac). Sie hat eine Konzentration von 18,18 ng/µl und ein mittleres Molekulargewicht von 8500 bp (± 20%) (Produktinformation E.coli DNA). Diese DNA ist frei von RNA und anderen Stoffen, die eine Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen verhindern würden, weswegen sie für die Verwendung des DPN1- Enzyms passend ist.

Die E. coli- DNA diente als positive Kontrolle in der PCR mit den E.coli Primern und als negative Kontrolle in der PCR mit den β- Globin Primern.

Umgekehrt benutzten wir als positive Kontrolle in der PCR mit den β- Globin Primern und als negative Kontrolle für die E.coli Primern DNA aus Blut. Die DNA wurde aus 10 ml frischem

menschlichem Blut mittels peripherer Venenpunktion und anschließender Isolierung gewonnen (s. Anhang: DNA Extraktion aus EDTA Blut, sowie 2.1.1).

2.4.2 Gelelektrophorese

Das Vorbereiten der Gele und die Elektrophorese erfolgten unter einer Abzugshaube. Dabei wurde nur mit Nitrilhandschuhen gearbeitet. Die Gele wurden dann in einem Fotolabor unter UV Licht gescannt und auf USB-Datenträger gespeichert.

2.4.2.1 der PCR Produkte

Die PCR Produkte wurden dann in einem **2 %** (2g Agarose gelöst in 100 ml 1x TAE Puffer) Agarose-Gel getrennt. Dem Gel wurden 1,5 µl unverdünntes Ethidiumbromid zugegeben. Von jeder Probe wurden für die Elektrophorese 10 µl verwendet.

Die Taq Polymerase in der PCR wurde zusammen in einem Farbstoff geliefert. Der Farbstoff ersparte einen separaten Ladepuffer, weshalb das PCR Amplifikat direkt nach der PCR auf das Agarosegel geladen werden konnte.

5 µl von einem Molekulargewichtmarker MW (100 bp DNA Leiter) wurden benutzt.

Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 120 V für 40 min durchgeführt.

2.4.2.2 der genomischen DNA

Die Qualität der isolierten DNA wurde in einem **0,8 %** (0,8 g Agarose gelöst in 100 ml 1x TAE Puffer) Agarose-Gel geprüft. Dem Gel wurden 1,5 µl unverdünntes Ethidiumbromid zugegeben. Von jeder Probe wurden für die Elektrophorese 5 µl mit 5µl von einem blauen Ladepuffer (Gel loading Dye Blue, 6x) gemischt und auf das Agarosegel geladen.

Eine Spannung von 80 V wurde angelegt und die Elektrophorese für 30 Minuten durchgeführt.

2.5 Optimierungsmethoden

Abb. 5 zeigt das Versuchsdesign der Optimierungsmethoden. Die entsprechende Benennung der Proben zeigt Tab.1, wobei bei den Proben S1Ø-S13Ø (Methode 0) das Oragene® Isolierungsprotokoll angewendet wurde (s. Anhang Oragene® DNA Isolierungsprotokoll).

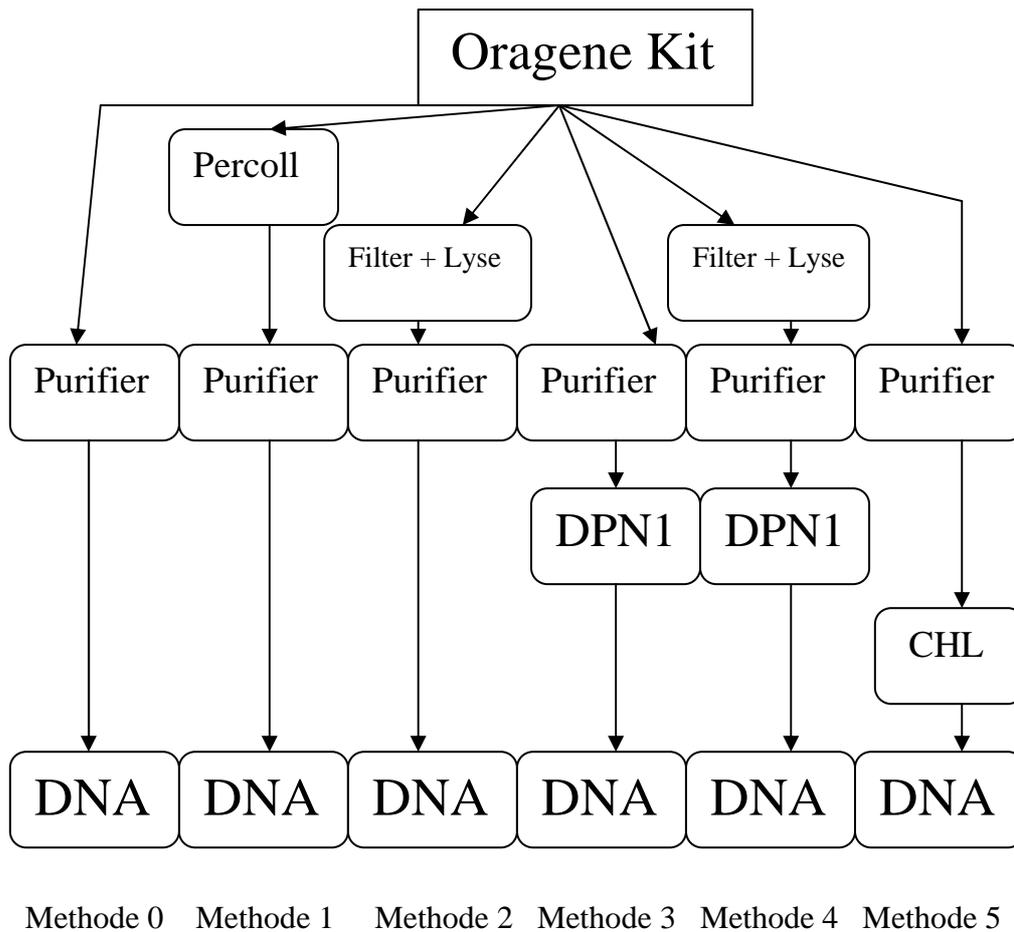


Abb.5. Versuchsdesign des ersten Teils der Arbeit (Optimierungsmethoden)

Probe	Filtration, Lyse	DPN 1	Chloroform	Methode
S1 Ø				0
S2 Ø				0
S3 Ø				0
S4 Ø				0
S5 Ø				0
S6 Ø				0

S7 Ø				0
S8 Ø				0
S9 Ø				0
S10 Ø				0
S11 Ø				0
S12 Ø				0
S13 Ø				0
S1 Filt	+			2
S2 Filt	+			2
S3 Filt	+			2
S4 Filt	+			2
S5 Filt	+			2
S6 Filt	+			2
S7 Filt	+			2
S8 Filt	+			2
S1 DPN1		+		3
S2 DPN1		+		3
S3 DPN1		+		3
S4 DPN1		+		3
S5 DPN1		+		3
S6 DPN1		+		3
S7 DPN1		+		3
S8 DPN1		+		3
S1 Filt DPN1	+	+		4
S2 Filt DPN1	+	+		4
S3 Filt DPN1	+	+		4
S4 Filt DPN1	+	+		4
S5 Filt DPN1	+	+		4
S6 Filt DPN1	+	+		4
S7 Filt DPN1	+	+		4
S8 Filt DPN1	+	+		4
S9 CHL			+	5
S10 CHL			+	5
S11 CHL			+	5
S12 CHL			+	5
S13 CHL			+	5
E.coli DNA (bac)				

Tab.1. Benennung der Proben (Proben aus Methode 1 fehlen in der Tabelle, da sie keine besondere Benennung bekommen haben, s. 3.1.1)

2.5.1 Methode 1

Es wurde eine Dichtegradientenzentrifugation der Speichelproben mit Percoll durchgeführt, um die Bakterien von den Epithelzellen zu trennen. Hier wurden die Bedingungen von zwei anderen Studien modifiziert (s. unten: Colombo et al., 2006; Childs et al., 1988). Dabei wurden 3–5 ml Speichel bei 3000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Niederschlag wurde dann in 40 µl PBS-Puffer (1x) gelöst und zu 2 ml 50% Percoll – 50% PBS (1x) – Lösung dazugegeben. Dann wurde nochmal bei 11 000 g für 15 Minuten zentrifugiert und jeweils 500 µl von der oberen bzw. unteren Schicht pipettiert und unter dem Mikroskop untersucht.

Methode 1	Colombo et al., 2006	Childs et al., 1988
3-5 ml Speichel		
3000 rpm, 15 min		
40 µl PBS (1x) + Pellet	50 µl DMEM + Pellet	150 µl Pellet
2 ml 50% Percoll/50% PBS	1 ml 50% Percoll/50% PBS	4 ml 50% Percoll/50% PBS
11 000g, 15 min	11 000g, 15 min	31 000g, 18 min
500-1000 µl Flüssigkeit unter Mikroskop beobachten		

2.5.1.1 Gram – Färbung

Anschließend wurden die Proben durch die Gram-Färbung angefärbt (s. Anhang: Gram-Färbung), um die Anwesenheit von Bakterien zu überprüfen.

Die Untersuchung unter dem Objektiv erfolgte mit Immersionsöl, wobei die Objektträger für 5 Minuten bei 50°C auf einer Heizplatte erwärmt, ein Tropfen DePeX dazugegeben und dann mit einem Deckgläschen gedeckt wurden.

2.5.2 Methode 2

2.5.2.1 Filtration

Ziel der Filtrierung war das Beseitigen der Mikroorganismen aus dem Speichel. Diese Methode basierte auf die unterschiedliche Größe von Bakterien und Zellen. Während die Bakterien nur etwa $1\mu\text{m}$ groß sind, sind die menschlichen bukkalen Epithelzellen etwa $60 - 80\mu\text{m}$ groß (s. Abb.1). Wir haben für dieses Ziel Isopore® Filtermembrane gewählt, die $12\mu\text{m}$ große Poren und einen Durchmesser von 25 mm hatten. Diese Membrane, die aus Polycarbonat bestehen, hatten den Vorteil, dass sie direkt unter dem Lichtmikroskop beobachtet werden können, weil sie durchsichtig sind. So konnte man z.B. nach der Filtrierung und dem Waschen der Filter überprüfen, ob sich Epithelzellen auf der Membran befanden. Die Filter wurden in speziellen Filterhalter so positioniert, wie es vom Hersteller angegeben wurde und dann bei 121°C autoklaviert. Dann wurde die Filtrierung folgendermaßen durchgeführt:

- Die ganze Oragene/Speichel – Lösung wurde mit einer Spritze von der Oragene Tube entnommen
- Die Flüssigkeit wurde auf 40 ml mit PBS-Puffer (1x) in einer Tube verdünnt
- Zentrifugieren bei 3000 rpm für 10 min
- Die Flüssigkeit wurde weggeworfen, der Niederschlag nicht

Mit diesem Waschschritt beseitigte man Bakterien aufgrund der unterschiedlichen Größe und der damit verbundenen unterschiedlichen Sedimentation.

- Der Niederschlag wurde dann wieder in 40 ml PBS-Puffer (1x) verdünnt
- Mit einer 18G Kanüle und dreimalige Aspiration wurde der Niederschlag aufgelockert
- Für jede Probe wurden zwei Filtermembrane benutzt:
- 1. Filter

- 10 ml Speichel-Lösung filtrieren

- mit 10 ml PBS-Puffer (1x) waschen
- 10 ml Speichel-Lösung filtrieren
- mit 10 ml PBS-Puffer (1x) waschen

- Mit dem 2. Filter wurde die gleiche Reihenfolge mit den restlichen 20 ml Speichellösung durchgeführt

Als Kontrolle wurde das Filtrat in einer neuen Tube gesammelt und dann bei 3000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, um zu sehen, ob sich ein Niederschlag aus Zellen, die durch den Filter durchgekommen sind, gebildet hat.

- Die beiden Filtermembrane (und evtl. das Gummiring) wurden in einer neuen Tube gesammelt

2.5.2.2. Lyse

Die Oragene® Flüssigkeit und die zelllyisierenden Substanzen drin wurden bei der Filtrierung ausgewaschen. Deswegen war es nötig einen zelllyisierenden Schritt zwischen der Filtrierung und der DNA Isolierung zwischenzuschalten. Das Protokoll „Aqua Screen® Extraktionskit“ (Internetreferenz 5) wurde modifiziert und es wurde entsprechend verfahren:

- 1 ml SE-Puffer wurde zu den Filtern zugegeben (s. Anhang: DNA Extraktion aus frischem EDTA – Blut)
- Mischen
- Zentrifugieren bei 3000 rpm für 5 Minuten.
- Die Filter wurden rausgenommen
- 5 µl Proteinase K und 50 µl 20% SDS-Puffer wurden zugegeben
- Die Probe wurde über Nacht am Rüttler gelassen
- 1 ml SE-Puffer wurde zugegeben
- Die Probe wurde bei 55°C für 5 Minuten inkubiert, damit die DNA freigesetzt wird.

2.5.2.3. DNA Isolierung und DNA Qualitätskontrolle

Anschließend erfolgte die DNA Isolierung mit dem Oragene® Purifier laut Oragene® Protokoll. Danach wurde die DNA Konzentration mit NanoDrop gemessen und der A260/A280 Quotient wurde ermittelt. Die isolierte genomische DNA wurde auf 0,8% Agarose - Gel auf ihre Unversehrtheit geprüft. Zusätzlich wurde eine PCR mit einigen Proben durchgeführt, um human- bzw. bakterienspezifische DNA zu amplifizieren, die dann auf 2% Agarose-Gel identifiziert werden sollte.

2.5.3 Methode 3

Um den Gehalt an bakterieller DNA zu verringern, wurde die DNA, nachdem sie mit dem Oragene® Kit isoliert wurde, mit dem Restriktionsenzym DPN1 behandelt. Die Reaktionsbedingungen vom entsprechenden Protokoll (Internetreferenz 6) sind modifiziert:

	Variante 1	Variante 2
DNA	22 µl	22 µl
NE-Puffer 4 (10x)	2,5 µl (1/10 des Reaktionsvolumens)	2,5 µl (1/10 des Reaktionsvolumens)
Enzym DPN1 (20 U/µl)	0,5 µl (1-5 U/µg DNA)	0,5 µl (1-5 U/µg DNA)
Endvolumen	25 µl	25 µl
Inkubation bei 37°C	2h	über Nacht

Wir nahmen von jeder DNA Probe 22 µl. Dazu wurden 2,5 µl von dem mitgeliefertem NE-Puffer 4 und 0,5 µl DPN1 (±10 U) entsprechend dem Protokoll zugegeben. Die Probe wurde gut gemischt und runterzentrifugiert. Danach wurde der Inhalt der ersten Reaktion bei 37°C

für zwei Stunden und die zweite Reaktion bei 37°C über Nacht inkubiert. Danach wurde die DNA Konzentration mit NanoDrop gemessen und der A260/A280 Quotient wurde ermittelt. Die Qualität der isolierten genomischen DNA wurde auf 0,8% Agarose-Gel geprüft. Zusätzlich wurde eine PCR mit einigen Proben durchgeführt, um human- bzw. bakterienspezifische DNA zu amplifizieren, die dann auf 2% Agarose-Gel identifiziert werden sollte.

2.5.4 Methode 4

Hier wurde versucht die bakterielle DNA durch Kombination aus Methoden 2 (Filtrierung) und Methode 3 (DPN1 Behandlung) zu beseitigen. Nachdem die Proben entsprechend dem Protokoll aus Methode 2 filtriert wurden und die DNA isoliert wurde, wurden die Proben mit 0,5 µl DPN1 Enzym über Nacht entsprechend dem Protokoll aus Methode 3 (Variante 2) inkubiert. Danach wurde die DNA Konzentration mit NanoDrop gemessen und der A260/A280 Quotient wurde ermittelt. Zusätzlich wurde eine PCR mit einigen Proben durchgeführt, um human- bzw. bakterienspezifische DNA zu amplifizieren, die dann auf 2% Agarose-Gel identifiziert werden sollte.

2.5.5 Methode 5

Ziel der Methode 5 war die Qualität der bereits isolierten DNA aus Methode 0 durch einen zusätzlichen Schritt zu verbessern. Nachdem die DNA aus den Speichelproben mit dem Oragene® Kit isoliert wurde (Methode 0), wurde die DNA mit Chloroform entsprechend dem Protokoll (Iwasiow R.M. et al, 2006) behandelt, um Resttrübung und Unreinheiten zu beseitigen:

- Chloroform (1/20stel des Volumens der DNA Probe) zugeben (mindestens 2,5 µl)
- Mischen für einige Sekunden
- Zentrifugation bei 14 000 rpm, 15 min

- Obere Schicht (enthielt DNA) wurde in ein neues Gefäß übertragen (untere Schicht enthielt Chloroform)

Danach wurde die DNA Konzentration mit NanoDrop gemessen und der A260/A280 Quotient wurde ermittelt.

Alle Versuche mit Chloroform wurden wegen seiner toxischen Wirkung unter ausreichendem Luftabzug durchgeführt.

2.6. Statistische Analyse

Die Prüfung auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors-Test ergab p-Werte zwischen 0,007 und 0,200 und zeigte damit eine Abweichung einiger Methoden von der Normalverteilung. Daher wurde ein nicht parametrisches statistisches Verfahren angewendet (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für abhängige Stichproben). Da in unserer Studie multiple Paarvergleiche durchgeführt wurden, sollte das Signifikanzniveau nach Bonferroni korrigiert und bei 0,01 liegen ($p < 0,01$). Durch die Bonferroni-Korrektur wurde das alpha-Fehler-Niveau derart drastisch gesenkt, dass sich trotz enormer Unterschiede einzelner Methoden keine signifikanten Ergebnisse zeigten. Da in einigen Vergleichen eine geringe Stichprobengröße erschwerend hinzukam, wurde in der vorliegenden Arbeit auf die Anwendung der Bonferroni-Korrektur verzichtet und das konventionelle Signifikanzniveau von 0,05 festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Prüfung der Methoden

3.1.1 Methode 1

Die Versuche mit der Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll scheiterten noch am ersten Schritt (die Trennung der Bakterien von den Epithelzellen), so dass keine DNA Isolierung stattfinden konnte. Die lichtmikroskopische Untersuchung der Schichten, entnommen aus den Proben, zeigte nur vereinzelte Epithelzellen und keine Bakterien in der oberen Schicht. Im Gegensatz dazu befanden sich in der unteren Schicht dichte Ansammlungen von Epithelzellen und agglomerierten Bakterienhaufen. Es konnte keine Trennung der Bakterien von den Epithelzellen durchgeführt werden.

3.1.2 DNA Quantität und DNA Reinheit

3.1.2.1 Methode 0

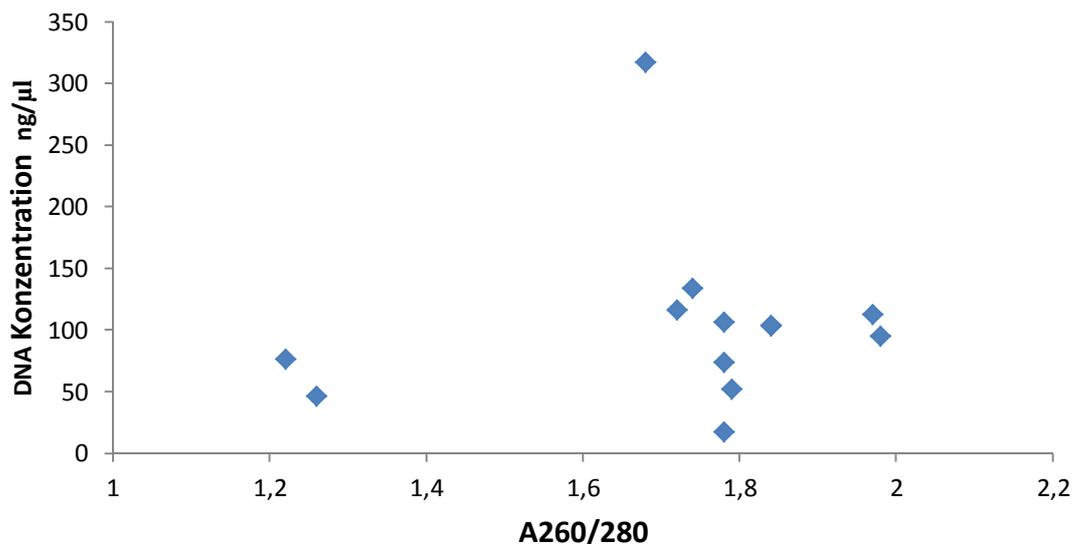


Abb.6. DNA Konzentration (y - Achse) und A260/280 Werte (x - Achse) der 13 Ausgangsproben S1Ø- S13Ø (Methode 0) (zwei Proben sind wegen ähnlichen DNA Konzentrationen und gleichen A260/280 Werte überlagert abgebildet)

Die DNA Konzentration der Proben S1Ø-S13Ø (Methode 0) reichte von 17,33 bis 317,07 ng/µl mit einem Median von 103,38 ng/µl.

Der Median der A260/280 Werte für die Proben S1Ø-S13Ø war 1,78 (Abb.6).

3.1.2.2 Methode 2

Methode	Anzahl Proben	DNA Konzentration (ng/µl)			A260/A280 Ratio		
		Median	Min	Max	Median	Min	Max
0	8	103,64	17,33	116,34	1,81	1,72	1,98
2	8	9,35	3,03	19,30	1,81	1,52	2,21

Tab.2. DNA Konzentration und DNA Qualität der filtrierten Proben (Methode 2) im Vergleich zu den Ausgangsproben (Methode 0)

Der Median für die DNA Konzentration der Ausgangsproben S1- S8 in Methode 0 war 103,64 ng/µl und änderte sich nach anschließender Filtrierung (Methode 2) auf 9,35 ng/µl. Die beiden Methoden unterschieden sich bezüglich Konzentration signifikant voneinander (p=0,012) (Tab.2)(Abb.7).

Der Median für die A260/280 Werte für die Proben S1-S8 in Methode 0 war 1,81. Methode 2 unterschied sich nicht signifikant von Methode 0 bezüglich des A260/280 Wertes (p=0,889) (Tab.2)(Abb.7).

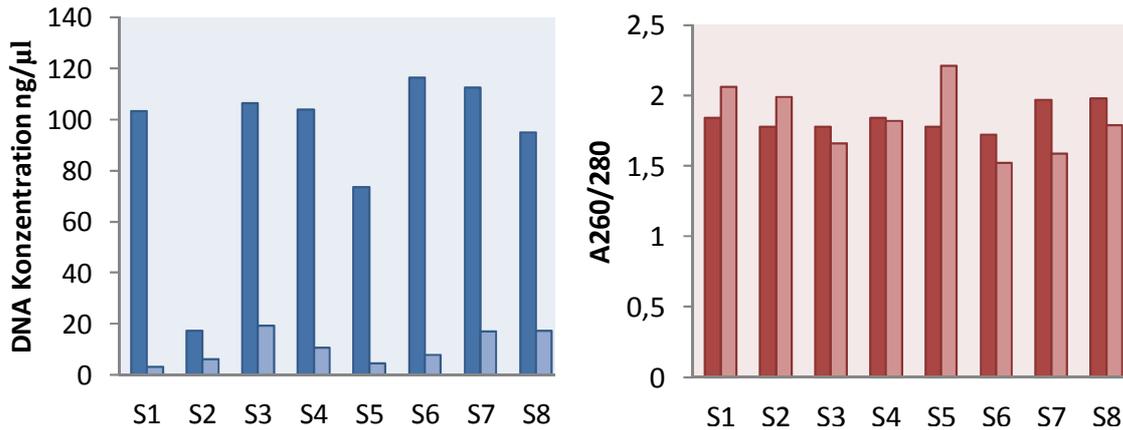


Abb.7. Vergleich der DNA Konzentrationen der Proben S1-S8 vor (Methode 0) und nach Filtrierung (Methode 2) (linke blaue Abb.) und Vergleich der A260/280 Werte derselben Proben vor und nach Filtrierung (rechte rote Abb.) Proben der Methode 0 (dunkelblau und dunkelrot), Proben der Methode 2 (hellblau bzw. rosa)

3.1.2.3 Methode 3

Hier haben wir Methode 3 genauer analysiert: hier wurden die zwei Varianten der DPN1 Behandlung mit der Null-Methode verglichen (Tab.3)

Methode	Anzahl Proben	DNA Konzentration (ng/µl)			A260/A280 Ratio		
		Median	Min	Max	Median	Min	Max
0	8	103,64	17,33	116,34	1,81	1,72	1,98
3 2h	8	94,12	12,66	118,31	1,36	0,71	1,51
3 über Nacht	8	111,06	16,82	140,43	1,41	0,44	1,54

Tab.3. DNA Konzentration und DNA Qualität der mit DPN1 behandelten Proben (zwei Varianten der Methode 3) im Vergleich zu den Ausgangsproben (Methode 0)

Abb.8 zeigt die Änderung der DNA Konzentrationen der Proben S1-S8 und bac (bakterielle DNA) nach den verschiedenen Behandlungen mit dem Enzym DPN 1.

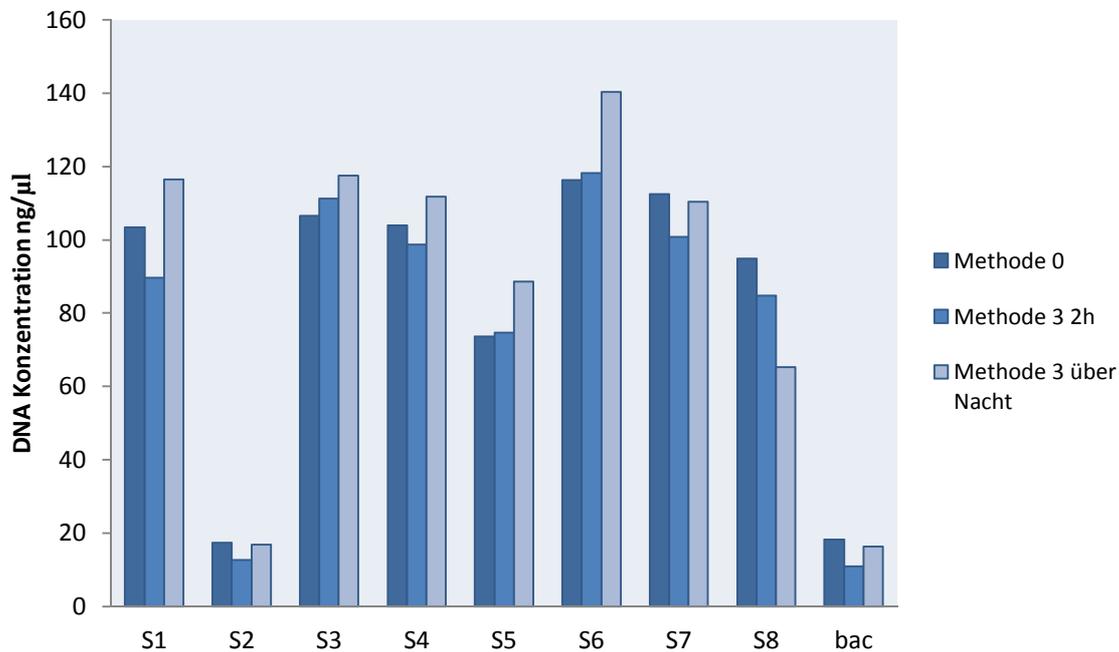


Abb.8. DNA Konzentrationen der Proben S1-S8 und bac (bakterielle DNA) in Methode 0 (dunkelblau), nach Behandlung mit 0,5 µl DPN1 für 2h (blau) und nach Behandlung mit 0,5µl DPN1 über Nacht (hellblau)

Der Median für die DNA Konzentration der Ausgangsproben S1Ø- S8Ø in Methode 0 war 103,64 ng/µl und verringerte sich nach 2-stündiger DPN1 Behandlung mit 0,5 µl Enzym (Methode 3, Variante 1) auf 94,12 ng/µl. Nach DPN1 Behandlung über Nacht (Methode 3, Variante 2) war der Median für die DNA Konzentration 111,06 ng/µl (Tab.3). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Methode 0 und den beiden Varianten der Methode 3 bzgl. DNA Konzentration festgestellt werden ($p=0,123$ bzw. $p=0,327$).

Der Median für die A260/280 Werte für die Proben S1Ø-S8Ø in Methode 0 war 1,81. Der Wert fiel nach der 2-stündigen DPN1 Behandlung auf 1,36 bzw. auf 1,41 nach der DPN1 Behandlung über Nacht (Tab.3). Somit unterschieden sich die beiden Varianten der Methode 3 bzgl. des Ratios signifikant von Methode 0 ($p=0,012$ bzw. $p=0,012$) (Abb.9).

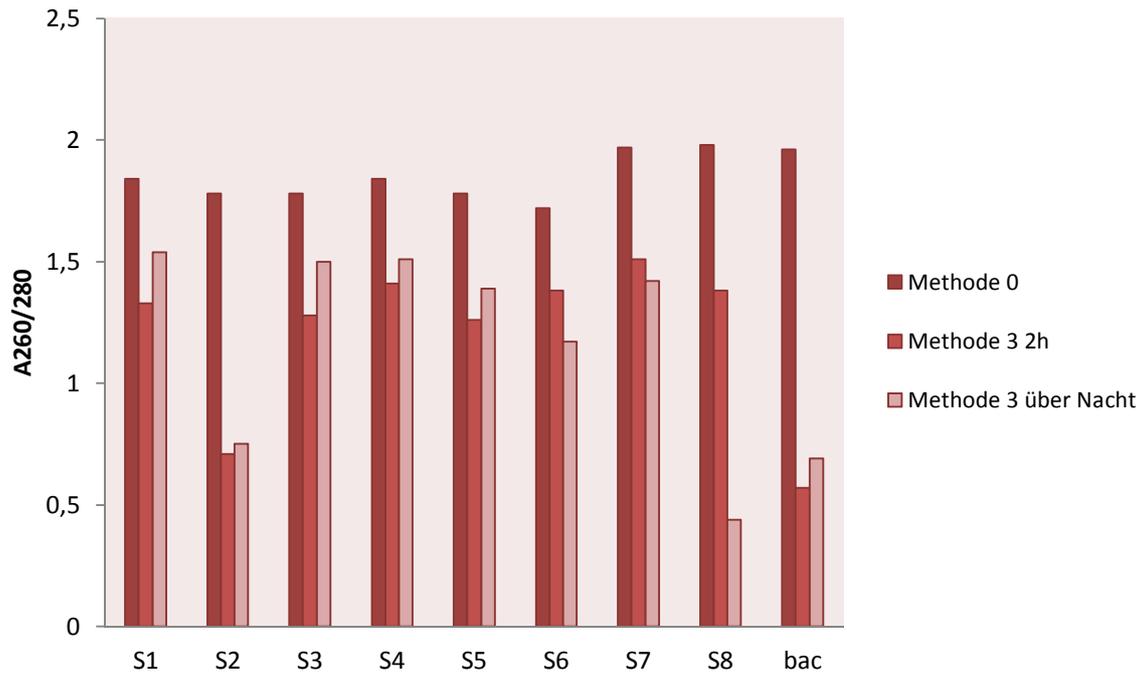


Abb.9. A260/280 Werte der Proben S1-S8 und bac (bakterielle DNA) in Methode 0 (dunkelrot), nach Behandlung mit 0,5 µl DPN1 für 2h (rot) und nach Behandlung mit 0,5µl DPN1 über Nacht (rosa)

3.1.2.4 Methode 4

Methode	Anzahl Proben	DNA Konzentration (ng/µl)			A260/A280 Ratio		
		Median	Min	Max	Median	Min	Max
0	8	103,64	17,33	116,34	1,81	1,72	1,98
4	8	5,64	2,59	55,61	0,38	0,16	1,47

Tab.4. DNA Konzentration und DNA Qualität der Proben aus Methode 4 im Vergleich zu den Ausgangsproben (Methode 0)

Es wurde ein signifikanter Unterschied zwischen Methode 0 und Methode 4 bzgl. DNA Konzentration und DNA Qualität gefunden ($p=0,012$ bzw. $p=0,012$). Der mediane Wert für die DNA Konzentration der Ausgangsproben S1Ø-S8Ø in Methode 0 war 103,64 ng/µl und verringerte sich nach der Filtrierung (Methode 2) und nach anschließender DPN1 Behandlung der Proben über Nacht (Methode 4) auf 5,64 ng/µl (Tab.4)(Abb.10)

Der mediane A260/280 Wert in Methode 0 für die Ausgangsproben S1Ø-S8Ø war 1,81. Nach Filtrierung (Methode 2) und nach anschließender DPN1 Behandlung über Nacht (Methode 4) fiel der mediane Ratio auf 0,38 (Tab.4)(Abb.10).

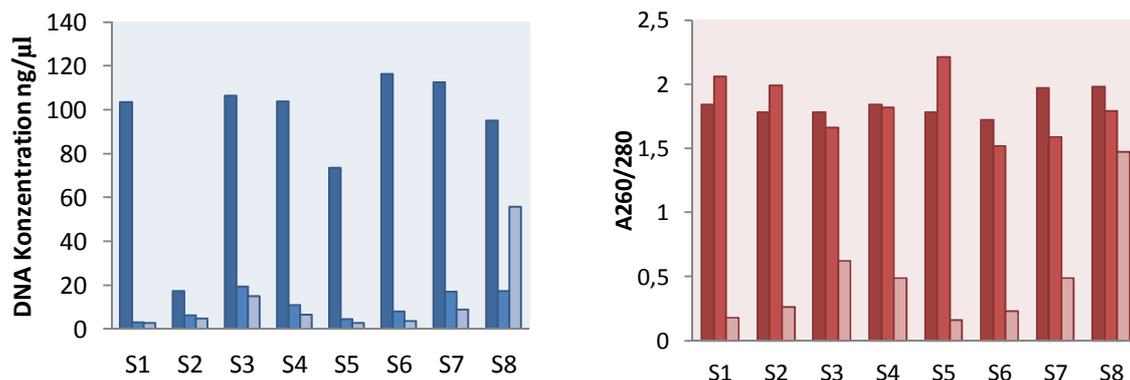


Abb.10 Vergleich der DNA Konzentrationen der Proben S1-S8 in der Nullmethode (Methode 0, dunkelblau), nach Filtrierung (Methode 2, blau) und nach anschließender DPN1 Behandlung (Methode 4, hellblau) (links) und Vergleich der A260/280 Werte derselben Proben in Methode 0 (dunkelrot), nach Filtrierung (Methode 2, rot) und nach anschließender DPN1 Behandlung (Methode 4, rosa) (rechts)

3.1.2.5 Methode 5

Nach den zahlreichen Versuchen mit den isolierten Speichelproben S1Ø- S8Ø wurden die DNA Proben aufgebraucht, so dass die DNA Isolierung von neuen 5 Proben (S9Ø-S13Ø) notwendig wurde. Abb.11 zeigt die entsprechenden Ergebnisse von den NanoDrop Messungen in Methode 5.

Methode	Anzahl Proben	DNA Konzentration (ng/µl)			A260/A280 Ratio		
		Median	Min	Max	Median	Min	Max
0	5	76,48	46,16	317,07	1,68	1,22	1,79
5	5	50,04	30,75	277,91	1,82	1,23	1,91

Tab.5. DNA Konzentration und DNA Qualität der mit Chloroform behandelten Proben (Methode 5) im Vergleich zu den Ausgangsproben (Methode 0)

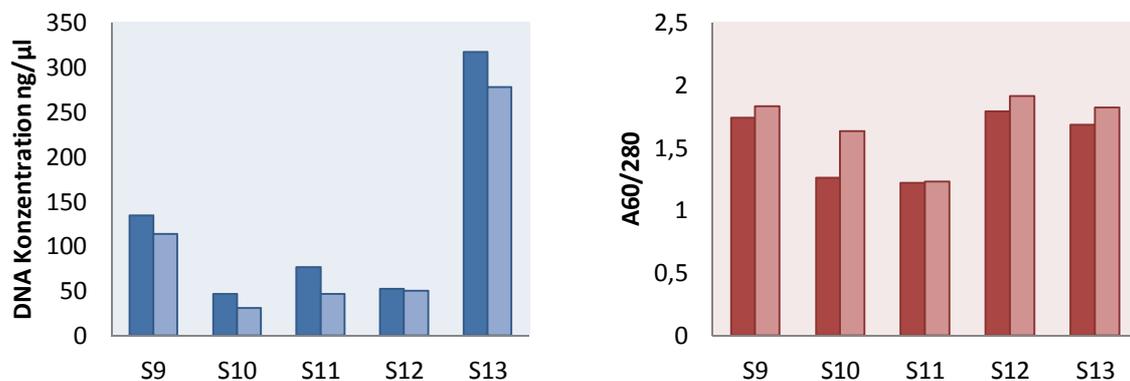


Abb.11. Vergleich der DNA Konzentrationen der Proben S9-13 in der Nullmethode (Methode 0, dunkelblau) und nach Behandlung mit Chloroform (Methode 5, hellblau) (links) und Vergleich der A260/280 Werte derselben Proben in Methode 0 (dunkelrot) und nach Chloroform Behandlung (Methode 5, rosa) (rechts)

Methode 5 unterschied sich sowohl bei den Konzentrations-, als auch bei den Ratiowerten signifikant von der Ausgangsmethode 0 (beide p-Werte=0,043). Die mediane DNA Konzentration der Ausgangsproben S9Ø-S13Ø war 76,48 ng/µl. Nach Chloroform - Behandlung (Methode 5) verringerte sich die mediane Konzentration auf 50,04 ng/µl (Tab.5). Der mediane A260/280 Wert der Ausgangsproben S9Ø-S13Ø in Methode 0 war 1,68. Der Wert erhöhte sich nach Chloroform Behandlung (Methode 5) auf 1,82 (Tab.5).

3.1.3 DNA Integrität

Die Qualität der isolierten genomischen DNA wurde mithilfe der 0,8% Agarose - Gelelektrophorese auf ihre Unversehrtheit geprüft. In Abb.12 sind die Banden der hochmolekularen DNA aus den Ausgangsproben S1Ø-S8Ø, sowie zur Kontrolle von menschlicher DNA aus Blut deutlich zu erkennen. Bei der bakteriellen DNA (bac) konnte nur eine Verschmierung über einen weiten Bereich beobachtet werden.

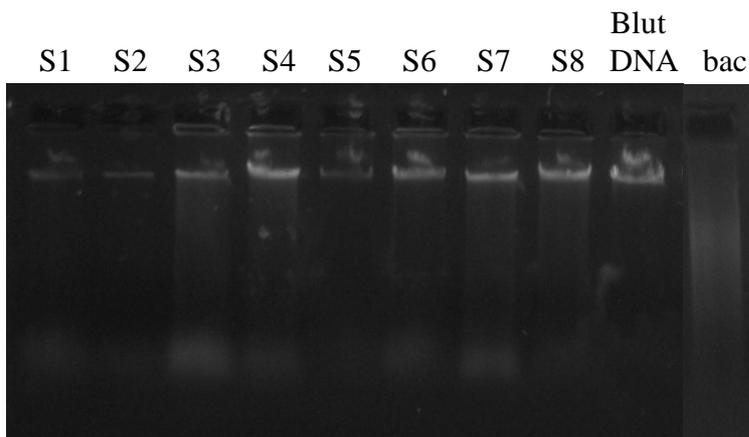


Abb.12. Gelelektrophorese der genomischen DNA, isoliert aus den Ausgangsproben S1Ø- S8Ø in Methode 0, sowie DNA, isoliert aus Blut, und bakterielle DNA (bac)

Im Gegensatz dazu erschien in der Gelelektrophorese der getesteten Proben nach Filtrierung (Methode 2), außer einer dünnen Bande der Probe S7Filt, keine sichtbare DNA (Abb. 13).

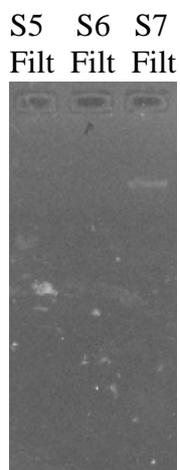


Abb.13. Gelelektrophorese der genomischen DNA, isoliert aus den Speichelproben S5, S6, S7 in Methode 2 (Filtrierung)

In Abb.14 erkennt man deutliche Banden hochmolekularer DNA nach Behandlung der Proben S2-S5 mit dem Enzym DPN1. Zur Kontrolle wurden eine DNA Probe aus Blut und bakterieller DNA (bac) mit dem Enzym behandelt. Bei den Proben mit der bakteriellen DNA (Gellöcher 2 und 8) konnte keine sichtbare Bande, sondern nur eine Verschmierung beobachtet werden. Die gut sichtbaren Banden der DNA aus Blut (Gellöcher 1 und 7) zeigten, dass die DPN1 Behandlung die Qualität der genomischen DNA aus Blut nicht beeinträchtigt. Ansonsten konnten visuell zwischen den zwei Varianten der Enzymbehandlung der DNA Proben (2-stündigen- vs. über Nacht- Behandlung) in der Gelelektrophorese keine gravierende Unterschiede bezüglich DNA Konzentration, DNA Qualität und bakteriellem Gehalt festgestellt werden.

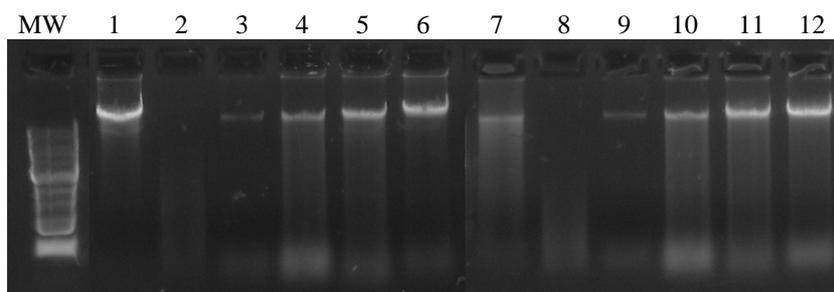


Abb.14. Gelelektrophorese der genomischen DNA, isoliert aus den Ausgangsproben S2, S3, S4 und S5 in Methode 3, sowie mit DPN1 behandelte DNA aus Blut und mit DPN1 behandelte bakterielle DNA (bac)

(MW: DNA Leiter, 1-6: Behandlung mit 0,5µl DPN1 für 2h, 7-12: Behandlung mit 0,5 µl DPN1 über Nacht jeweils mit Proben Blut DPN1, bac DPN1, S2 DPN1, S3 DPN1, S4 DPN1, S5 DPN1)

3.1.4 PCR Amplifikation von bakterieller DNA mit Primern für E.coli

Um die Präsenz von bakterieller DNA in den isolierten Proben zu überprüfen, wurde eine PCR mit den Primern für eine bakterielle DNA mit einer Länge von 193 bp durchgeführt (s.2.4.1). Die anschließende Gelelektrophorese (Abb.15) zeigte, dass sich die sichtbaren

Banden tatsächlich in diesem Bereich (etwa 200 bp) befanden. Bakteriell kontaminiert waren zwei von drei getesteten filtrierten Proben aus Methode 2 (Gellöcher 4 und 5), beide getestete Proben aus Methode 4 (Gellöcher 6 und 7), zwei von drei getesteten Proben aus Methode 3 (Gellöcher 8 und 9), sowie sechs von sieben getesteten Ausgangsproben aus Methode 0 (Gellöcher 11,12,13,15,16 und 17). Bei der Blutprobe (Gelloch 1) konnte man eine Verschmierung beobachten. Untypisch war auch, dass eine schwache Amplifikation bei der mit DPN1 behandelten DNA aus Blut (Gelloch 19) stattfand. Der direkte Vergleich der Amplifikate in den Gellöchern 2 (bac) und 18 (bac DPN1) zeigte, dass die bakterielle DNA nach Behandlung mit dem Enzym DPN1 nicht mehr intakt und unbeschädigt war.

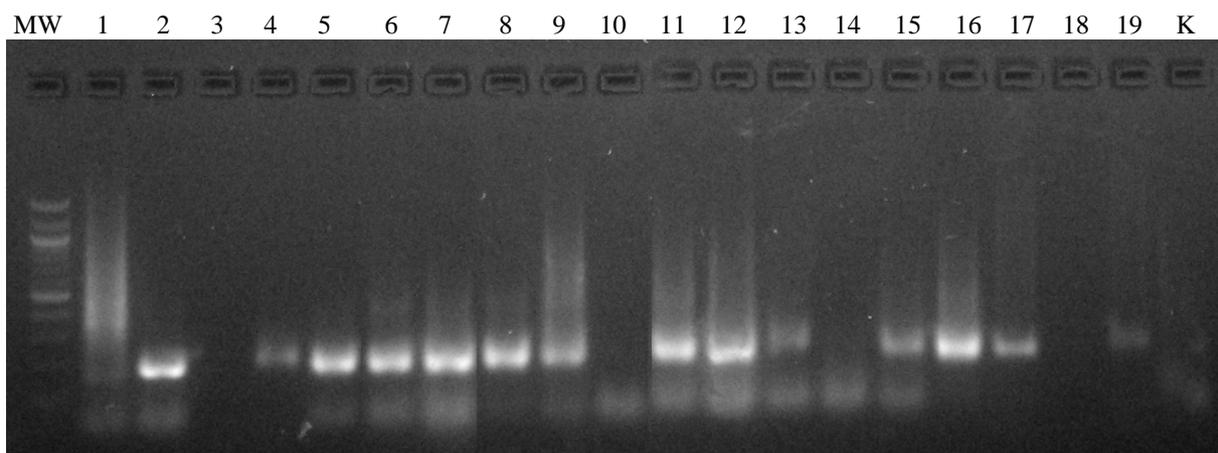


Abb. 15. Gelelektrophorese der PCR Amplifikate von PCR mit Primern für E.coli für verschiedene Proben

(MW: DNA Leiter, 1: Blut DNA, 2:bac DNA, 3-5:Methode 2 (S5Filt,S6Filt,S7Filt), 6-7: Methode 4 (S6 FiltDPN1, S7FiltDPN1), 8-10: Methode 3 (S3DPN1, S4DPN1, S5DPN1), 11-17: Methode 0 (S1Ø,S3Ø,S4Ø,S5Ø,S6Ø,S7Ø,S8Ø), 18: bac DPN1, 19: Blut DNA DPN1, K: Kontrolle ohne DNA)

3.1.5 PCR Amplifikation von humanspezifischer DNA (hDNA)

Eine PCR mit den Primern für den menschlichen β - Globin und die anschließende Gelelektrophorese der PCR Amplifikate zeigte die Anwesenheit menschlicher DNA in den Proben (Abb.16). Die Banden befanden sich genau in dem Bereich, der der Größe des β - Globin Gens entspricht, und zwar bei 268 bp (s.2.4.1). Abb. 16 demonstriert, dass humane

genomische DNA in der Blutprobe (Gelloch 1), sowie in einer der drei getesteten Filtrierungsproben aus Methode 2 (Gelloch 5), in einer der beiden getesteten Proben aus Methode 4 (Gelloch 7), in allen getesteten Proben aus Methode 3 (Gellöcher 8, 9 und 10), sowie in sechs von sieben getesteten Proben aus Methode 0 (Gellöcher 11-16) präsent waren. Erwartungsgemäß fand in den bakteriellen Proben (Gellöcher 2 und 18), sowie in der Kontrollprobe ohne DNA (K) keine Amplifikation statt. Andererseits fehlte überraschenderweise bei der mit DPN1 behandelten Blutprobe (Gelloch 19) die Bande.

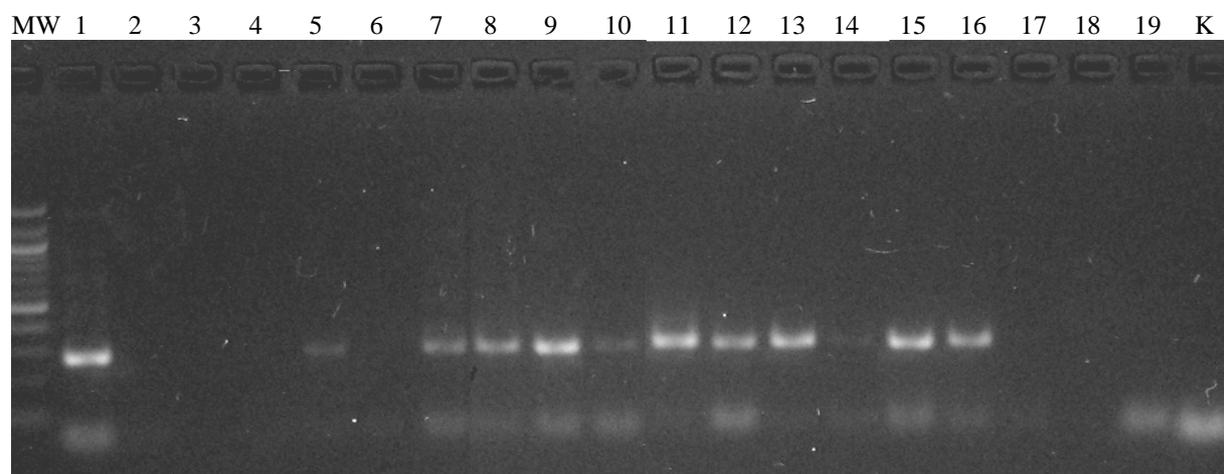


Abb.16. Gelelektrophorese der PCR Amplifikate von PCR mit Primern für β - Globin für verschiedene Proben

(MW: DNA Leiter, 1: Blut DNA, 2:bac DNA, 3-5:Methode 2 (S5Filt, S6Filt, S7Filt), 6-7: Methode 4 (S5Filt DPN1, S7Filt DPN1), 8-10: Methode 3 (S3DPN1, S4DPN1, S5DPN1), 11-17: Methode 0 (S1Ø,S3Ø,S4Ø,S5Ø,S6Ø,S7Ø,S8Ø), 18: bac DPN1, 19: Blut DNA DPN1, K: Kontrolle ohne DNA)

In Tab.6 sind die Ergebnisse für die Optimierungsmethoden im Vergleich zur der Null Methode bezüglich DNA Konzentration und DNA Qualität zusammengefasst.

	Methode 1	Methode 2	Methode 3 (Variante 1 und 2)	Methode 4	Methode 5
DNA Konz.	n.m.	-	n.s.	-	-
A260/280	n.m.	n.s.	-	-	+

Tab.6. Zusammenfassung der Ergebnisse der Optimierung (+ signifikant besser, - signifikant schlechter, n.m. nicht messbar, n.s. nicht signifikant)

3.2 Ergebnisse der Rückmeldkontrolle der Onlinestudie

3.2.1 Teilnahme

Für den zweiten Teil der Studie wurden 5620 Probanden von der Datenbank mit 65 000 bereits chronotypisierten Personen eingeladen den Online Fragebogen MCTQ, den sie vor bis zu vier Jahren ausgefüllt haben, erneut auszufüllen. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse veranschaulicht. 941 Probanden hat unsere Email-Einladung nicht erreicht („email failure delivery“). Von den 4679 eingeladenen Probanden, die unsere Einladung tatsächlich bekommen haben, haben 1304 (28%) den neuen Fragebogen tatsächlich ausgefüllt. Von anderen 192 Probanden wussten wir, dass sie entweder nicht teilnehmen wollten, oder sie sich nicht in Deutschland befanden. Für die restlichen 3183 (68%) Eingeladenen vermuteten wir, dass sie kein Interesse oder Zeit hatten, an der Studie teilzunehmen, da wir keine Antwort bekommen haben.

Von allen aktuellen Teilnahmen (1304) wurden 404 schon mal eliminiert, weil sie den Fragebogen nur teilweise beantwortet haben oder weil für sie ein Ausschlusskriterium wie z.B. Schichtarbeit oder nichtdeutsche Abstammung zutraf. Von den restlichen 900 wurden 715 Probanden per Email gebeten, ihre Speichelprobe zu spenden. Bei eventuellem Mangel an Speichelproben sollte auf die anderen 185 Probanden zugegriffen werden.

Von den 715 Einladungen entfielen erneut 45, weil die Email – Einladung nicht geliefert werden konnte (6% von 715). Von den restlichen 670 entfielen 165 wegen keiner Einwilligung zur Teilnahme (25% von 670) und weitere 16 wegen fehlender Antwort (2%

von 670). Die Mehrheit (73%) von den 670 Eingeladenen hat der Speichelspende zugestimmt und so wurden 489 Speichelkits per Post zugeschickt.

3.2.2 Speichelkits zurück

464 (95% von 489 Zugestimmten) Speichelkits (eins davon leer) kamen auch tatsächlich zurück. 25 Kits kamen nicht zurück.

3.2.3 DNA Isolierung

Ein Behälter, der wahrscheinlich lose zugeschraubt war, kam leer zurück und ließ daraus schließen, dass sich die Probe auf dem Postweg entleert hat. Die DNA von allen anderen 463 zurückgeschickten Behältern wurde isoliert. 60 von den DNA-/Speichelproben konnten nicht die Speichel-/DNA- Qualitätskontrolle bestehen (die Speichelproben waren bei der visuellen Betrachtung zu trüb, sehr viskös oder stark verschmutzt oder die DNA war von schlechter Qualität).

403 DNA Proben (87% von allen 464 zurückgeschickten Speichelproben) haben die Qualitätskontrollbedingungen erfüllt, nachdem sie mit Chloroform analog der Methode 5 in dieser Studie behandelt wurden. Die genaue Optimierung dieser Proben wurde in einer anderen Studie durchgeführt (Autor: Svilen Stoyanov, Arbeit: im Gange).

A	MCTQ (2003) Datenbank	65 000	
B	MCTQ (2008-09) Einladungen der extremen Typen	5620 -941	email failure delivery
C	Gültige Email - Adresse	4679 (100%) -3183 -184 -8	keine Antwort wollen nicht teilnehmen nicht in Deutschland
D	MCTQ Teilnahmen	1304 (28% von C) -320 -185 -84	teilweise ausgefüllt nicht eingeladen für Speichelprobe Ausschlusskriterien
E	Einladungen der Extreme per Email für Speichelprobe	715 (55% von D) -45	email failure delivery
F	Zugestellte Einladungen per Email für Speichelprobe	670 -165 -16	wollen nicht teilnehmen keine Antwort
G	Positive Antworten	489 (73% von F)	
H	Speichelkits für Extreme per Post	489 (73% von F) -25	nicht zurückgekommen
I	Speichelkits zurück	464 (95% von H) -1 -60	leerer Behälter schlechte Speichel-/DNA Qualität
J	Gute DNA Qualität und DNA Konzentration	403 (87% von I)	

Tab.7. Ergebnisse des zweiten Teils: Rückmeldkontrolle

4. Diskussion

4.1 Optimierungsmethoden

In unserer Studie war der Median der DNA Menge in den 13 Speichelproben, isoliert mit der Oragene® Methode, 10,3 µg. Ähnliche Ergebnisse haben auch Hansen et al. (mittlere DNA Menge 10,8 µg von 0,5 ml Oragene/Speichel Flüssigkeit) gefunden. Über deutlich höheren DNA Gehalt berichten Rylander-Rudqvist et al. (Median der DNA Menge 29,4 µg) und H.C. Birnboim von DNA Genotek Technical Bulletin (Medianwert 110 µg DNA) in ihren Studien. Die unterschiedlichen Resultate könnten mit der unterschiedlichen Menge an Oragene/Speichel Flüssigkeit, die benutzt wurde, erklärt werden. In den beiden zuletzt genannten Studien wurde dieser DNA Gehalt von 2 ml bzw. 4 ml gewonnen, wir haben nur 0,5 ml Oragene/Speichel Flüssigkeit für die Isolierung benutzt.

Die Qualität der isolierten DNA wurde durch Berechnung des A260/280 Quotienten und durch Gelelektrophorese überprüft. Der mediane A260/280 Quotient der Proben mit der Oragene® Methode in unserer Studie betrug 1,78, was vergleichbar ist mit den Werten in den Studien von Hansen et al. (Mittelwert 1,63) und Rylander-Rudqvist (Mittelwert 1,76). Die sehr gute Qualität der DNA bewies auch die durchgeführte Gelelektrophorese, wo alle acht untersuchten Proben hochmolekulare (>23 kb) DNA enthielten.

Eine erfolgreiche Amplifikation von menschlichem β-Globin Gen fand in 86% der untersuchten Ausgangsproben statt (s. Abb.16 Nummer 11-17), was wiederum in Konkordanz mit den Ergebnissen von anderen Studien ist (Hansen et al. (84%).

In dieser Studie haben wir den genauen Gehalt von bakterieller DNA in den Proben nicht gemessen. Allerdings, es ist bekannt, dass Proben aus dem Mund (Speichel, Wangenstäbchen) bakteriell kontaminiert sind. Das konnten wir in unserer Studie auch beweisen, in dem eine PCR mit Primern für bakterielle DNA durchgeführt wurde und alle Proben außer einer deutliche Kontaminierung zeigten (s. Abb.15, Nummer 11-17). Bei der einen Probe war

wahrscheinlich die DNA - Ausgangskonzentration zu niedrig und es konnte sich keine sichtbare Bande in der Gelelektrophorese bilden.

Die bakterielle Kontaminierung ist auch von der Art und Weise abhängig, wie die Speichelprobe nach der Sammlung aufbewahrt wurde. Das Oragene® Kit enthält antibakterielle Substanzen, die die Vermehrung von Keimen verhindern. So zeigt die Oragene® Methode den niedrigsten Bakteriengehalt von allen Verfahren für Gewinnung von DNA aus der Mundhöhle (DNA Genotek Chartier et al., 2005). Obwohl die Speichelproben keine reine humane DNA enthielten, haben mehrere Studien (Rylander-Rudqvist et al., 2006, Hansen et al., 2007, DNA Genotek Technical Bulletin, 2005, Cormier T. et al.) gezeigt, dass sie eine gute Alternative zu Blutproben für molekulargenetische epidemiologische Studien sind. Van Oene et al. behaupten, dass die DNA vom Oragene® Kit bei der Genotypisierung mit dem SNPstream® System gleiche Ergebnisse liefert wie die DNA vom Blut. Bahlo et al. bewiesen in ihrer Studie die Nützlichkeit der DNA von Speichel in GWAS. Die Zuverlässigkeit und Genauigkeit der Oragene® Methode in epidemiologischen Studien beweist auch die ständig wachsende Anzahl an wissenschaftlichen Publikationen mit dieser Methode: von 4 in 2005 und 10 in 2006, über 72 in 2009, bis 271 Publikationen in 2012 (Internetreferenz 8, Stand: Februar 2013).

In unserer Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll sollten sich laut Studien von Childs et al. und Colombo et al. nach der Zentrifugation zwei Schichten bilden, wobei die obere Schicht Epithelzellen mit befestigten Bakterien und die untere Schicht nur Bakterien enthält. Leider konnten die Epithelzellen in unseren Versuchen nicht von den unbefestigten Bakterien getrennt werden. Eine erfolgreiche Trennung würde aber die Bakterienzahl nur vermindern und die Keime nicht ganz eliminieren, weil die Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll nur die nicht befestigten Bakterien beseitigt. Der Rest von den Bakterien, die spezielle Haftmoleküle (sog. Adhäsine) besitzen, haftet fest an den Epithelzellen (Childs et al., 1988).

Die reine Filtrierung (Methode 2) lieferte im Vergleich zu der Null – Methode gute A260/280 Werte, schneidete aber bei der DNA Konzentration deutlich schlechter ab (s. 3.1.2.2 und Tab.6). Die Gelelektrophorese der genomischen DNA aus Methode 2 (Abb.13) und die PCR mit den Primern für β – Globin (Abb.16) als Kontrolle für die DNA Quantität und Qualität bestätigte dies.

Die zusätzliche Behandlung der Proben aus Methode 2 mit dem Enzym DPN1 (Methode 4) hat die DNA Qualität signifikant verschlechtert (s.3.1.2.4 und Tab.6). Die durchgeführten PCR zeigten, dass beide untersuchten Proben aus Methode 4 (s. Abb. 15: S6FiltDPN1 und S7FiltDPN1) bakteriell kontaminiert waren, während in nur einer Probe Amplifikation von menschlicher DNA (s. Abb.16: S7FiltDPN1) stattfand. Die niedrigen DNA Konzentrationen der Probe in Methoden 2 und 4 zeigten, dass bei dem Filtrierungsvorgang viele Epithelzellen verloren gingen, während die mehreren Zwischenschritte die bakterielle Kontaminierung wahrscheinlich begünstigten.

Die Behandlung der Null–Proben mit dem Enzym DPN1 (Methode 3) verschlechterte signifikant die A260/280 Ratios, bei statistisch gleichbleibenden DNA Konzentrationen (s. 3.1.2.3 und Tab.6). In der 0,8%-igen Gelelektrophorese (s.Abb.14) der mit DPN1 behandelten bakteriellen DNA, konnte keine sichtbare Bande, sondern nur eine Verschmierung beobachtet werden, was als eine Degradierung der fremden DNA gedeutet werden kann. Allerdings war diese Verschmierung auch bei der reinen bakteriellen DNA (bac) in Abb.12 zu beobachten, was wahrscheinlich auf die niedrige Konzentration (18,18 ng/ μ l) der niedermolekularen DNA (8,5 kb) zurückzuführen ist. Zusätzlich konnten keine Unterschiede zwischen der Amplifikation vor (Proben S3 \emptyset , S4 \emptyset und S5 \emptyset) und nach Behandlung (Proben S3DPN1, S4DPN1 und S5DPN1) mit DPN1 in beiden PCR festgestellt werden (s. Abb. 15 und 16) was zu Folge hatte, dass die DPN1 Behandlung die Qualität der DNA verschlechterte, ohne die bakterielle Kontamination zu eliminieren. Das Enzym schien

aber mit reiner bakterieller DNA (bac) sehr gut zu wirken und schädigte die DNA dermaßen, dass die in der PCR nicht mehr vervielfältigt werden konnte (Abb. 15: bac und bacDPN1).

So sahen die Ergebnisse nach Behandlung der Null-Proben mit Chloroform (Methode 5) aus: das A260/280 Ratio nach der Chloroform Behandlung änderte sich signifikant (konnte angehoben werden) (s.3.1.2.5). Das ist in Konkordanz mit der in der Studie von Iwasiow et al. erzielten Erhöhung des Ratios. Die DNA Konzentration nach der Behandlung mit Chloroform verringerte sich in unseren Experimenten signifikant (s.3.1.2.5), während in der Studie von Iwasiow et al. die Konzentration gleich blieb. So hat sich rausgestellt, dass die Chloroform Methode 5 ein gutes Verfahren zu Verbesserung der Qualität der isolierten DNA ist, ohne ihre Integrität zu beeinflussen und ohne ihre Anwendung in Prozessen wie PCR zu beeinträchtigen (Iwasiow et al., 2006).

Unsere Befunde zeigten, dass die Chloroform Methode 5 bezüglich DNA Qualität allen anderen getesteten 4 Methoden überlegen ist. Sie ist einfach und schnell durchzuführen und viele Zwischenschritte entfallen.

Wir konnten außerdem schlussfolgern, dass obwohl die bakterielle Kontaminierung aus den Speichelproben nicht ganz eliminiert werden konnte, konnte man durch einen zusätzlichen Reinigungsschritt mit Chloroform immernoch gute DNA Qualität erzielen.

4.2 Rückmeldkontrolle

In epidemiologischen Studien mit Probanden ist äußerst wichtig, dass die Rückmeldungsrate hoch ist, damit die Ergebnisse eine allgemeine Gültigkeit haben. In unserer Studie war es möglich innerhalb einigen Monaten genügend Probanden per Internet und Email zu werben, damit am Ende ausreichend DNA Material für eine GWAS vorlag. Die Mehrheit (69%) von den eingeladenen für eine Speichelspende Probanden, hat auch eine Speichelprobe

zurückgeschickt. In 87% von den isolierten Speichelproben war die Speichelqualität und –
quantität ausreichend, um eine „high-throughput“ Genotypisierung durchzuführen.

Andere Studien über die Rückmeldung und die Bereitschaft der Probanden eine
Speichelprobe für genetische Untersuchungen zu spenden, haben ähnliche Befunde erhoben.
So betrug die Rückmeldungsrate in den Studien von Etter et al. und Rylander-Rudqvist et al.
80%, während Hansen et al. von 72% von ihren Probanden eine Speichelprobe
zurückbekamen. Mehr ausführliche Information, anschauliche Graphiken, Erinnerungsemails
oder sogar die Publizierung von sog. FAQ`s (frequently asked questions) auf der Website
könnten sinnvolle Maßnahmen sein, um die Erfolgsrate solcher Studien zu verbessern.

Die Online-Werbung von Probanden für genetische Studien ohne persönliches Kennenlernen,
wo das Übereinstimmen von Personeninformation und Genmaterial sichergestellt werden
sollte, wird immer häufiger angewendet. In unserer Studie haben die Probanden ihren Namen,
Alter und Geschlecht in dem Online-Fragebogen ausgefüllt und dann nochmal in der per Post
zurückgeschickten Einverständniserklärung. Alle Speichelproben konnten danach einem
bestimmten Fragebogen zugeordnet werden, was bewies, dass die Methode zuverlässig war.

Die Oragene® Methode ist in einigen Studien schon benutzt worden und unsere
Untersuchung zeigte, dass die Methode einfach und leicht durchführbar ist und von den
Probanden sehr gut akzeptiert wurde. Sie ist nichtinvasiv und weniger riskant als die
Venenpunktion und schließt die Ausführung durch medizinisches Personal aus. Es existieren
andere Methoden für die Isolierung von DNA aus Speichel, wir haben aber den effektivsten
und vom Arbeitsablauf einfachsten ausgesucht. Der größte Vorteil von der Oragene®
Methode gegenüber allen anderen Alternativen (Mundwasser, Bürstchen, Stäbchen) liegt
darin, dass die Probanden keine komplizierten Einleitungen folgen müssen wie Reiben der
Mundschleimhaut, Lufttrocknen der Stäbchen oder Verlegen der Probe auf eine Karte.
Außerdem liefert die Oragene® Methode laut der Studie von H.C. Birnboim (DNA Genotek
Technical Bulletin) im Vergleich zu den anderen Methoden die höchste DNA Quantität.

Somit ist die Oragene® Methode in Kombination mit dem zusätzlichen hier beschriebenen Chloroform-Protokoll eine gute Möglichkeit für die DNA Sammlung für genetische epidemiologischen Studien mit Probanden, die per Internet oder Email geworben wurden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie haben wir versucht eine Methode zur Gewinnung von DNA aus Speichel zu optimieren. Die Studie ist Teil eines größeren Projektes, das die Zusammenhänge zwischen Genotyp (DNA aus Speichelproben) und Phänotyp (Schlafverhalten) in Probanden untersucht, die zuvor mithilfe eines Online-Fragebogens als extreme Chronotypen identifiziert wurden. In dem zweiten Teil unserer Studie haben wir die Teilnahmebereitschaft dieser Probanden, eine Speichelprobe zu spenden, überprüft.

Die Untersuchung des menschlichen Erbguts für wissenschaftliche Ziele (z.B. Genotypisierung des gesamten Genoms WGGT: whole genome genotyping) erfordert hohe Mengen an DNA mit guter Qualität. Bis in kurzer Zeit war nur das menschliche Blut Quelle hochqualitativer DNA. Die Blutentnahme ist aber schmerzhaft, erfordert die Durchführung von geschultem Personal und ist mit bestimmten Risiken verbunden. Diese Tatsachen können viele Probanden abschrecken und so die Teilnehmerate deutlich verringern. Es wurde deswegen nach alternativen Methoden gesucht und so haben sich in den letzten Jahren Selbstentnahmetechniken zur DNA Isolierung aus Speichel bzw. Mundschleimhautepithelien durchgesetzt. Diese Verfahren haben sich als einfach, schnell, kostengünstig und sehr effizient erwiesen, haben aber alle einen entscheidenden Nachteil – sie sind bakteriell kontaminiert.

Dafür haben wir als erstes verschiedene Optimierungsmethoden zur Beseitigung der bakteriellen DNA entwickelt und anschließend überprüft, ob hiermit die Qualität und Quantität der menschlichen DNA beeinträchtigt wurde. Insgesamt wurden fünf Modifikationen der Null – Methode untersucht: (1) Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll, (2) Filtrierung, (3) Behandlung mit dem Enzym DPN1, (4) Filtrierung und Enzymbehandlung und (5) Chloroformbehandlung. Als zweiter Schritt wurden Probanden per

Email eingeladen, ihre Speichelprobe für Studienzwecke zur Verfügung zu stellen, wobei dann eine Rückmeldkontrolle durchgeführt wurde.

Die Ergebnisse zeigten, dass in vier von den fünf Optimierungsmethoden die DNA Qualität bzw. Quantität im Vergleich zu der Null-Methode reduziert wurden: bei der Dichtegradientenzentrifugation waren die Variablen nicht messbar, bei den Filtrierungsschritten gingen große Mengen an Mundschleimhautepithelien verloren, während die DPN1 Behandlung das A260/280 Verhältnis drastisch verschlechterte. Als einzig guter Optimierungsschritt bezüglich DNA Qualität hat sich die Chloroform - Behandlung erwiesen. Der Gehalt an bakterieller DNA wurde jedoch nicht wesentlich beeinflusst.

In dem zweiten Teil der Studie haben sich 73% von allen Eingeladenen für eine Speichelprobe bereit erklärt, von denen 95% tatsächlich eine geschickt haben. 87% der Speichelproben haben dann die DNA Qualitätskontrolle bestanden.

Unsere Befunde, unterstützt auch von der Literatur, haben gezeigt, dass die Oragene® Methode eine gute Alternative zu Blutproben für große epidemiologische Studien ist. Zwar enthalten die Proben geringe Mengen an bakterieller DNA, für die DNA Qualität scheint dies weniger von Bedeutung zu sein, so dass weitere Untersuchungen wie PCR oder Genotypisierung nicht negativ beeinflusst werden. Jedoch empfiehlt sich hier ein zusätzlicher Reinigungsschritt mit Chloroform, um die DNA Qualität für die Genotypisierung des gesamten Genoms zu verbessern.

In unserer Studie ist es uns gelungen genügend Probanden per Internet und Email zu werben, damit ausreichend genetisches Material für eine epidemiologische Studie vorlag. Somit zeichnet sich die internetbasierte Rekrutierung ohne persönliches Treffen mit den Probanden durch hohe Teilnahmerate aus, was zeitsparend und besonders günstig ist bei Untersuchungen über weite geografische Regionen.

6. Literaturverzeichnis

Internetreferenz 1:

<http://gc.nci.nih.gov/Sequence%20analysis/Constants%20from%20Eppendorf.html>

Internetreferenz 2: <http://de.wikipedia.org/wiki/CpG-Insel>

Internetreferenz 3: <http://www.bcm.edu/mcfweb/?PMID=3100>

Internetreferenz 4: <http://de.wikipedia.org/wiki/Polymerase-Kettenreaktion>

Internetreferenz 5: www.minerva-biolabs.com/download/manuals/ASE_1007.pdf

Internetreferenz 6: [www.crypto.wustl.edu/Protocols%20PDFs/RE%20digests%20\(HL\).pdf](http://www.crypto.wustl.edu/Protocols%20PDFs/RE%20digests%20(HL).pdf)

Internetreferenz 7: Munich Chronotype Questionnaire, <http://www.bioinfo.mpg.de/wepgec/>.

Internetreferenz 8: <http://www.dnagenotek.com/US/support/scientificpublications.html>

Allebrandt KV, Roenneberg T., (2008), The search for circadian clock components in humans: new perspectives for association studies, *Braz J Med Biol Res.* 2008 Aug; 41(8):716-21.

Allebrandt KV, Amin N, Müller-Myhsok B, Esko T, Teder-Laving M, Azevedo RV, Hayward C, van Mill J, Vogelzangs N, Green EW, Melville SA, Lichtner P, Wichmann HE, Oostra BA, Janssens AC, Campbell H, Wilson JF, Hicks AA, Pramstaller PP, Dogas Z, Rudan I, Merrow M, Penninx B, Kyriacou CP, Metspalu A, van Duijn CM, Meitinger T, Roenneberg T., (2011), A K(ATP) channel gene effect on sleep duration: from genome-wide association studies to function in *Drosophila*, *Mol Psychiatry.* 2011 Nov 22. doi: 10.1038/mp.2011.142. [Epub ahead of print]

Anekella B., Wu J., Cunanan J., Huang C., Manak M., (2008), Comparison of DNA Extraction Methodologies and Quality of DNA from Buccal Cells Collected in Oragene Saliva Collection Kit and Scope Mouthwash, *SeraCare Life Sciences, Gaithersburg, MD.*

Bahlo M., Stankovich J., Danoy P., Hickey P.F., Taylor B.V., Browning S.R.; Australian and New Zealand Multiple Sclerosis Genetics Consortium (ANZgene), Brown M.A., Rubio J.P.,(2010), Saliva-derived DNA performs well in large-scale, high-density single-nucleotide polymorphism microarray studies., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010 Mar;19(3):794-8. Epub 2010 Mar 3.

Berger U., *Mikrobiologie der Mundhöhle*, Urban & Schwarzenberg, 1955.

Bräunig U., *Candidabesiedelung der Mundhöhle in Abhängigkeit vom kariösen Gebisszerstörungsgrad* 2003, Dissertation an der Justus-Liebig-Universität Gießen

Burkhart J.G., Burkhart B.A., Sampson K., Malling H.V., (1992), Evidence for a previously undetected CpG methyl-directed restriction system in *E. coli.*, *Nucleic Acids Res.* 1992 Aug 25;20(16):4368.

Childs W.C. 3rd, Gibbons R.J., (1988) Use of Percoll density gradients for studying the attachment of bacteria to oral epithelial cells, *J Dent Res.* 1988 May;67(5):826-30.

Colombo A.V., Silva C.M., Haffajee A., Colombo A.P., (2006), Identification of oral bacteria associated with crevicular epithelial cells from chronic periodontitis lesions, *J Med Microbiol.* 2006 May;55(Pt 5):609-15.

Cormier T. A., Tran K., Forman J., Jackson A., Lem P., Hardenbol P., SNP Genotyping of Saliva DNA using Affymetrix® GeneChip® Targeted Genotyping System - A comparison of the performance of paired blood and saliva DNA samples in the Affymetrix GeneChip Targeted Genotyping assay,

Cozier, Y., Palmer, J., and Rosenberg, L. (2003) Comparison of Methods for Collection of DNA Samples by Mail in the Black Women's Health Study. *AEP.* 14, 117-122.

DNA Genotek Technical Bulletin, H.C. Birnboim "DNA Yield with Oragene™"

DNA Genotek Technical Bulletin, J. Chartier and H.C. Birnboim (2004) Bacterial DNA Content with Oragene™, WP0003 Rev2.0 Feb, 2005

DNA Genotek Technical Bulletin, J. Chartier and H.C. Birnboim, Oragene™ is compatible with TaqMan® SNP genotyping, v1.0. DNA Genotek. Jan, 2005.

DNA Genotek, (2011), DNA quantification of Oragene®/saliva samples using SYBR® Green I Dye and a micro-plate reader, PD-PR-075 Issue 3/2011-11.

Dunlap J. C., Loros J. J., DeCoursey P. J. (2004), *Chronobiology biological timekeeping.* Sunderland (Mass.), Sinauer associates.

Etter J.F, Neidhart E., Bertrand S., Malafosse A., Bertrand D. (2005). Collecting saliva by mail for genetic and cotinine analyses in participants recruited through the Internet. *Eur J Epidemiol.* 2005; 20(10):833-8.

Feigelson, H. S., Rodriguez, C., Robertson, A., Jacobs, E., Calle, E., Reid, Y. et al. (2001) Determinants of DNA yield and quality from buccal cell samples collected with mouthwash. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 10, 1005-1008.

Garcia-Closas, M., Egan, K., Abruzzo, J., Newcomb, P., Titus-Ernstoff, L., Franklin, T. et al. (2001) Collection of Genomic DNA from Adults in Epidemiological Studies by Buccal Cytobrush and Mouthwash. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 10, 687-696.
Handbuch „Percoll Methodology and Applications“, Amersham Biosciences, 2002.

Hansen T., Simonsen M.K., Nielsen F.C., Hundrup Y.A. (2007) Collection of blood, saliva, buccal cell samples in a pilot study on Danish nurse cohort: comparison of the response rate and quality of genomic DNA. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 16, 2072-2076.

- Harty, L., Garcia-Closas, M., Rothman, N., Reid, Y., Tucker, M., and Hartge, P. (2000) Collection of buccal cell DNA using treated cards. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 9, 501–506.
- Heath E.M., Morken N.W., Campbell K.A., Tkach D, Boyd E.A., Strom D.A., (2001), Use of buccal cells collected in mouthwash as a source of DNA for clinical testing, *Arch Pathol Lab Med*. 2001 Jan;125(1):127-33.
- Hirsch – Kauffmann M.: *Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, Thieme Verlag, 2000.
- Iwasiow R.M., Birnboim H.C., (2006), From turbidity to clarity: Simple methods to improve the A260/A280 ratio of Oragene® DNA purified DNA samples, DNA Genotek Inc.
- Kanazawa S., Perina K., (2009), Why night owls are more intelligent. *Personality and Individual Differences* 47(7): 685-690.
- Kang JG., Kim S.H., Ahn TY (2006), Bacterial diversity in the human saliva from different ages, *J Microbiol*. 2006 Oct;44(5):572-6.
- Keller, C., *Ökologie der Mundhöhle*. Phillip Journal 1-2, 1994.
- Kerkhof G. A., (1985). Inter-individual differences in the human circadian system: a review, *Biol Psychol* 20(2): 83-112.
- King I.B., Satia-Abouta J., Thornquist M.D., Bigler J., Patterson R.E., Kristal A.R., Shattuck A.L., Potter J.D., White E., (2002), Buccal cell DNA yield, quality, and collection costs: comparison of methods for large-scale studies, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002 Oct;11(10 Pt 1):1130-3.
- Lacks S., Greenberg B., (1975), A Deoxyribonuclease of *Diplococcus pneumoniae* Specific for Methylated DNA, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 250, No. 11, Issue of June 10, PP. 4060-4066, 1975.
- Le Marchand, L., Lum-Jones, A., Saltzman, B., Visaya, V., Nomura, A., and Kolonel, L. (2001) Feasibility of collecting buccal cell DNA by mail in a cohort study. 10, 701-703.
- Lehmann K. M., Hellwig E., *Einführung in die restaurative Zahnheilkunde*, Urban & Schwarzenberg, 1998.
- Lench N., Stanier P., Williamson R., (1988), Simple non-invasive method to obtain DNA for gene analysis. *Lancet*, 1: 1356–1358, 1988.
- Michelle A.M. Bon, Arletta van Oeveren-Dybicz, Frank A.J.T.M van den Bergh, (2000), Genotyping of HLA-B27 by Real-Time PCR without Hybridization Probes, *Clinical Chemistry* July 2000 vol. 46 no. 7 1000-1002.
- Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G., (1992), Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain

Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology*, Mar. 1993, P. 695-700.

NanoDrop Technical Support Bulletin, (2007), 260/280 and 260/230 Ratios.

Nelson M., Raschke E., McClelland M., (1993), Effect of site-specific methylation on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases, *Nucleic Acids Res.* 1993 Jul 1;21(13):3139-54.

Roenneberg T, Merrow M.. (2007), Entrainment of the human circadian clock, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2007;72:293-9.

Roenneberg T., Kumar C.J., Merrow M., (2007), The human circadian clock entrains to sun time. *Curr. Biol.* 2007; 17:R44-R45.

Roenneberg, T., Daan S., Merrow M., (2003). The art of entrainment, *J Biol Rhythms* 18(3): 183-194.

Roenneberg, T., Merrow M., (2003), The network of time: understanding the molecular circadian system, *Curr Biol* 13(5): R198-207.

Rylander-Rudqvist T., Hakansson N., Tybring G., Wolk A., (2006), Quality and Quantity of Saliva DNA Obtained from the Self-administrated Oragene Method—A Pilot Study on the Cohort of Swedish Men, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(9). September 2006, 1742-1745.

Saab Y.B., Kabbara W., Chbib C., Gard P.R., (2007), Buccal cell DNA extraction: yield, purity, and cost: a comparison of two methods, *Genet Test.* 2007 Winter; 11(4):413-6.

Steinbüchel A., Oppermann-Sanio F.B., *Mikrobiologisches Praktikum: Versuche Und Theorie*, Springer, 2003.

Templeton N.S., (1992), The polymerase chain reaction. History, methods, and applications, *Diagn Mol Pathol.* 1992 Mar; 1(1):58-72.

Toh K.L., Jones C.R., He Y., Eide E.J., Hinz W.A., Virshup D.M., Ptacek L.J., Fu Y.H. An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* 2001; 291:1040-1043.

Tylewska S.K., Gibbons R.J. (1987): Application of Percoll Density Gradients in Studies of the Adhesion of *Streptococcus pyogenes* to Human Epithelial Cells, *Curr Microbiol* 16:129-135.

Van Oene M., Alic S., Jackson A., Lem P. (2006), SNP genotyping of DNA from Oragene®/saliva samples with SNPstream®, MK-AN-014 Issue 3/2011-12

Voytas D. , Agarose gel electrophoresis (2001), *Curr Protoc Immunol.* 2001 May; Chapter 10:Unit 10.4.

Xu Y., Padiath Q.S., Shapiro R.E., Jones C.R., Wu S.C., Saigoh N., Saigoh K., Ptacek L.J., Fu Y.H. Functional consequences of a CKI δ mutation causing familial advanced sleep phase syndrom. *Nature* 2005; 434:640-644.

7. Anhang

7.1 Liste der Tabellen

Tab.1. Benennung der Proben.....	29
Tab.2. DNA Konzentration und DNA Qualität der filtrierten Proben (Methode 2) im Vergleich zu den Ausgangsproben (Methode 0).....	37
Tab.3. DNA Konzentration und DNA Qualität der mit DPN1 behandelten Proben (zwei Varianten der Methode 3) im Vergleich zu den Ausgangsproben (Methode 0).....	38
Tab.4. DNA Konzentration und DNA Qualität der Proben aus Methode 4 im Vergleich zu den Ausgangsproben (Methode 0).....	40
Tab.5. DNA Konzentration und DNA Qualität der mit Chloroform behandelten Proben (Methode 5) im Vergleich zu den Ausgangsproben (Methode 0).....	42
Tab.6. Zusammenfassung der Ergebnisse der Optimierung (+ signifikant besser, - signifikant schlechter, n.m. nicht messbar, n.s. nicht signifikant).....	47
Tab.7. Ergebnisse des zweiten Teils: Rückmeldkontrolle.....	49

7.2 Liste der Abbildungen

Abb. 1. Menschliche Epithelzelle aus der Wangenschleimhaut.....	9
Abb. 2. Restriktion von prokaryontischer DNA durch das Enzym DPN1.....	12
Abb. 3. Methylierungsmuster von eukaryontischer DNA.....	13
Abb. 4. MSF und Verteilung der Chronotypen in der deutschen Bevölkerung.....	18
Abb.5. Versuchsdesign des ersten Teils der Arbeit (Optimierungsmethoden).....	28
Abb.6. DNA Konzentration (y - Achse) und A260/280 Werte (x – Achse) der 13 Ausgangsproben S1Ø- S13Ø (Methode 0) (zwei Proben sind wegen ähnlichen DNA Konzentrationen und gleichen A260/280 Werte überlagert abgebildet).....	36
Abb.7. Vergleich der DNA Konzentrationen der Proben S1-S8 vor (Methode 0) und nach Filtrierung (Methode 2) (linke blaue Abb.) und Vergleich der A260/280 Werte derselben Proben vor und nach Filtrierung (rechte rote Abb.) Proben der Methode 0 (dunkelblau und dunkelrot), Proben der Methode 2 (hellblau bzw. rosa).....	38
Abb.8. DNA Konzentrationen der Proben S1-S8 und bac (bakterielle DNA) in Methode 0 (dunkelblau), nach Behandlung mit 0,5 µl DPN1 für 2h (blau) und nach Behandlung mit 0,5µl DPN1 über Nacht (hellblau).....	39
Abb.9. A260/280 Werte der Proben S1-S8 und bac (bakterielle DNA) in Methode 0 (dunkelrot), nach Behandlung mit 0,5 µl DPN1 für 2h (rot) und nach Behandlung mit 0,5µl DPN1 über Nacht (rosa).....	40
Abb.10 Vergleich der DNA Konzentrationen der Proben S1-S8 in der Nullmethode (Methode 0, dunkelblau), nach Filtrierung (Methode 2, blau) und nach anschließender DPN1 Behandlung (Methode 4, hellblau) (links) und Vergleich der A260/280 Werte derselben Proben in Methode 0 (dunkelrot), nach Filtrierung (Methode 2, rot) und nach anschließender DPN1 Behandlung (Methode 4, rosa) (rechts).....	41
Abb.11. Vergleich der DNA Konzentrationen der Proben S9-13 in der Nullmethode (Methode 0, dunkelblau) und nach Behandlung mit Chloroform (Methode 5, hellblau) (links) und Vergleich der A260/280 Werte derselben Proben in Methode 0 (dunkelrot) und nach Chloroform Behandlung (Methode 5, rosa) (rechts).....	42
Abb.12. Gelelektrophorese der genomischen DNA, isoliert aus den Ausgangsproben S1Ø- S8Ø in Methode 0, sowie DNA, isoliert aus Blut, und bakterielle DNA (bac).....	43
Abb.13. Gelelektrophorese der genomischen DNA, isoliert aus den Speichelproben S5, S6, S7 in Methode 2 (Filtrierung).....	43
Abb.14. Gelelektrophorese der genomischen DNA, isoliert aus den Ausgangsproben S2, S3, S4 und S5 in Methode 3, sowie mit DPN1 behandelte DNA aus Blut und mit DPN1 behandelte bakterielle DNA (bac).....	44
Abb. 15. Gelelektrophorese der PCR Amplifikate von PCR mit Primern für E.coli für verschiedene Proben.....	45
Abb.16. Gelelektrophorese der PCR Amplifikate von PCR mit Primern für β- Globin für verschiedene Proben.....	46

7.3 Materialliste

Agarose	Applichem	A2114,0500
Chloroform	Applichem	A3691,0500
Kristallviolett	Merck	5235
DePeX mounting medium Gurr®	VWR	361252B
DNA Leiter	BioLabs	N3231S
dNTPmix	ABgene	AB-0196
DPN 1	BioLabs	R0176S
E. coli DNA	Sigma	D4889
Ethanol absolut	ROTH	9065.2
Filtrationsvorsatz	Sartorius	16517E
Fuchsin Lösung	Fluka	87794
Glykogen	Invitrogen	10814-010
Iodine Lösung	Fluka	90107
Isopore Membrane, 25 mm	Millipore	TKTP02500
Kanüle Sterican®	B.Braun	4665120
KHCO ₃	Applichem	A2375,0500
Ladepuffer blau (6x)	BioLabs	B7021S
Na ₂ EDTA	Applichem	A2937,0100
Natriumchlorid	MERCK	1.06404
NEBuffer 4 (10x)		
(mitgeliefert mit DPN1)	BioLabs	B7004S
NH ₄ Cl	Applichem	A0988,0500
Oragene® DNA Kit	DNA Genotek	OG-250
Oragene® DNA Purifier	DNA Genotek	OG-L2P
PBS Puffer	Sigma	P5368
Percoll	Sigma	P4937

Primer Ecoli 1	metabion	80116B3-1277G12 52/53
Primer Ecoli 2	metabion	80116B3-1277H12 53/53
Primer β - Globin 1	metabion	80116B3-1277E12 50/53
Primer β - Globin 2	metabion	80116B3-1277F12 51/53
Proteinase K	BioLabs	P8102S
Red Hot [®] DNA Polymerase (mitgeliefert 10x Taq Puffer, 25mM MgCl ₂)	ABgene	AB-0406/B
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	ROTH	2326.2
Spritze Injekt [®] LL 10 ml	B.Braun	4606728V
TAE Puffer (10x)	Applichem	A1416,0500
TE Puffer (1x)	Applichem	A2575,1000

7.4 Einladung 1. Teil



INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE PSYCHOLOGIE

Zentrum für Chronobiologie

Ludwig-Maximilians-Universität München

Prof. Dr.rer.nat. Dr.med.habil. Till Roenneberg

Institut für Medizinische Psychologie, Goethestraße 31, D-80336 München

Tel. &49-(0)89-2180-75-608

Fax &49-(0)89-2180-75-238

e-mail roenneberg@lmu.de

Teilnehmerinformation und Einverständniserklärung

für die Teilnahme an der Untersuchung:

„DIE GENETIK DER INNEREN UHR DES MENSCHEN“

Sehr geehrte Studienteilnehmerin, sehr geehrter Studienteilnehmer,

mit diesem Schreiben möchten wir Sie über die Details der Studie unterrichten. Falls Sie sich entscheiden, als freiwillige Versuchsperson mitzumachen, bitten wir Sie, Ihr Einverständnis zu erklären. Beide Abschnitte, die Studieninformation und Ihre Einverständniserklärung, bitten wir Sie getrennt zu unterschreiben und an uns in dem beigefügten Freiumschlag zurückzuschicken (ein der beiden Exemplare können Sie für Ihre Unterlagen behalten).

Teilnehmerinformation

Unsere Schlafzeiten werden von zwei „Uhren“ kontrolliert: von der inneren, biologischen Uhr, die bestimmt, wann wir bereit sind zu schlafen oder aufzustehen, und von der äußeren, sozialen Uhr (z.B. dem Wecker). Je verschiedener diese beiden Uhren „ticken“, desto schwieriger kann es für Menschen sein, an allen Tagen genug Schlaf zu finden. Tierversuche und Untersuchungen am Menschen zeigen, dass das Schlafverhalten auch von Genen beeinflusst wird. Die Steuerung der inneren Uhr ist also eine angeborene Eigenschaft und deshalb individuell bei jedem Menschen. Wir versuchen mit dieser Studie und Ihrer Unterstützung nun genauer herauszufinden, welche Gene bestimmen, wie unsere Uhr tickt.

Sie können uns hierbei unterschützen, indem Sie eine Probe Ihres Speichels an uns zurückschicken. Wenn Sie sich freundlicherweise diese wenigen Minuten Zeit nehmen, helfen Sie uns die genetische Grundlage für extreme Früh- und Spättypen zu beweisen. Selbstverständlich achten wir sehr sorgfältig darauf, dass alle Auswertungen vollkommen anonym erfolgen!

Was machen wir mit Ihrer Speichelprobe?

In unserer Studie werden die Vorschriften zum Datenschutz strikt eingehalten. Sobald wir Ihre Speichelprobe erhalten haben, wird diese Probe kodiert. Somit kann Ihre Probe nur noch anhand eines Codes (eine fortlaufende Nummer) identifiziert werden. Das Erbgut aus den Zellen im Speichel wird am Institut für Medizinische Psychologie in München isoliert. Diese Daten werden ebenfalls kodiert. Das heißt, weder Ihr Name, noch Ihre Initialen, das Geburtsdatum, oder sonstige Angaben,

die auf Ihre Person Rückschlüsse zulassen könnten, können bei der Auswertung oder bei einer Veröffentlichung der Studienergebnisse zugeordnet werden.

Nutzen der Studie

Sie selbst haben möglicherweise keinen unmittelbaren Nutzen von der Teilnahme an dieser Studie, außer dem möglichen Beweis, dass Ihre Tendenz zum frühen oder späten Aufstehen genetisch bedingt ist. Die erzielten Erkenntnisse sind jedoch für das Verständnis des Schlafverhaltens und auch im Hinblick auf das Behandeln und Heilen von Schlafstörungen und -krankheiten von großer Bedeutung.

Für Ihre Mühe, Ihre Unterstützung und Ihr Interesse bedanken wir uns sehr!



Prof. Dr. Till Roenneberg (**Arbeitsgruppelleiter**)



Dr. Karla V. Allebrandt (**Projektleiterin**)

Informationsbestätigung:

Ich _____, geb. am _____
(Ihr Name in DRUCKSCHRIFT) (Geburtsdatum)

habe die vorangegangenen Seiten, auf denen mich Prof. Roenneberg und Dr. Allebrandt über das Wesen, die Ziele und die Tragweite der beschriebenen Untersuchung informiert, gelesen und alles verstanden.

Datum _____
(Ihre Unterschrift)

Einverständniserklärung

Ich erkläre mich mit der Teilnahme an der Studie „**DIE GENETIK DER INNEREN UHR DES MENSCHEN**“ und mit der Erhebung und Verwendung persönlicher Daten und Befunddaten einverstanden. Ich verpflichte mich meine EIGENE Speichelprobe für diese Studie abzugeben. Ich behalte mir das Recht vor, jederzeit – auch ohne Angabe von Gründen – die Einwilligung zur weiteren Teilnahme unwiderruflich zurückzuziehen.

Ich möchte Teilnehmen

Datum _____
(Ihre Unterschrift, falls Sie teilnehmen)

Ich möchte **NICHT** an dieser Studie teilnehmen:

Ich möchte NICHT Teilnehmen

Datum _____
(Ihre Unterschrift, **NUR** wenn sie **NICHT** teilnehmen möchten)

Versicherung

Hiermit versichern wir Ihnen, dass Ihre persönlichen Daten bei zurückgezogener Teilnahme aus unserer Datenbank vollständig gelöscht werden.

Allen Teilnehmern versichern wir, dass wir Ihre Erbgut-Daten nur anonymisiert und nur für die hier beschriebene Fragestellung verwenden werden. Alle persönlichen Daten werden vor der genetischen Analyse gelöscht.



Prof. Dr. Till Roenneberg (**Arbeitsgruppelleiter**)



Dr. Karla V. Allebrandt (**Projektleiterin**)

Zum Verbleib beim Studienteilnehmer

Informationsbestätigung:

Ich _____, geb. am _____
(Ihr Name in DRUCKSCHRIFT) (Geburtsdatum)

habe die vorangegangenen Seiten, auf denen mich Prof. Roenneberg und Dr. Allebrandt über das Wesen, die Ziele und die Tragweite der beschriebenen Untersuchung informiert, gelesen und alles verstanden.

Datum _____
(Ihre Unterschrift)

Einverständniserklärung

Ich erkläre mich mit der Teilnahme an der Studie „**DIE GENETIK DER INNEREN UHR DES MENSCHEN**“ und mit der Erhebung und Verwendung persönlicher Daten und Befunddaten einverstanden. Ich verpflichte mich meine EIGENE Speichelprobe für diese Studie abzugeben. Ich behalte mir das Recht vor, jederzeit – auch ohne Angabe von Gründen – die Einwilligung zur weiteren Teilnahme unwiderruflich zurückzuziehen.

Ich möchte Teilnehmen

Datum _____
(Ihre Unterschrift, falls Sie teilnehmen)

Ich möchte **NICHT** an dieser Studie teilnehmen:

Ich möchte NICHT Teilnehmen

Datum _____
(Ihre Unterschrift, **NUR** wenn sie **NICHT** teilnehmen möchten)

Versicherung

Hiermit versichern wir Ihnen, dass Ihre persönlichen Daten bei zurückgezogener Teilnahme aus unserer Datenbank vollständig gelöscht werden.

Allen Teilnehmern versichern wir, dass wir Ihre Erbgut-Daten nur anonymisiert und nur für die hier beschriebene Fragestellung verwenden werden. Alle persönlichen Daten werden vor der genetischen Analyse gelöscht.





Prof. Dr. Till Roenneberg (**Arbeitsgruppelleiter**)

Dr. Karla V. Allebrandt (**Projektleiterin**)

7.5 Einladungen 2. Teil

7.5.1 Brief für Rekrutierung von Probanden für die epidemiologische Studie

Liebe Studienteilnehmerin, lieber Studienteilnehmer,

Sie erinnern sich vielleicht, dass Sie an unserer Internetstudie über Chronotypen teilgenommen haben (falls Sie sich nicht mehr daran erinnern ist dies kein Wunder, da unsere Datenbank bis auf das Jahr 2003 zurückgeht). Wir hatten Ihnen damals bereits im Vorfeld mitgeteilt, dass wir eventuell auf Sie zurückkommen werden, falls Ihr Chronotyp für unsere Forschung besonders interessant ist.

Erst einmal vielen Dank für Ihre damalige Teilnahme. Sie haben mit dazu beigetragen, dass wir nun auf mehr als 65.000 ausgefüllte Fragebögen zurückgreifen können. Durch diese hohen Zahlen erhalten wir ein sehr genaues Bild über die Verteilung der Chronotypen in der Bevölkerung. Unsere Erkenntnisse erlauben uns auch, mehr über die möglichen Gefahren zu lernen, die ein Leben gegen die innere Uhr mit sich bringen könnte.

Wir begrüßen es, wenn Sie uns auch weiterhin darin unterstützen, mehr über die innere Uhr des Menschen herauszufinden. Wenn Sie also dazu bereit sind, dann finden Sie alle Informationen auf folgender Webseite (<http://www.bioinfo.mpg.de/wepqec/>).

Sie bekommen Zugang zu dieser Webseite indem Sie sich dort als neuer Nutzer anmelden. Bei Ihrer Anmeldung geben Sie bitte das selbe Emailkonto an, über welches Sie diese Einladung bekommen haben.

Wir bitten wir Sie einige Internet-Fragebögen auszufüllen. In deren Einleitung finden Sie nähere Informationen zu dieser Studie.

Achtung! Falls Sie nicht mehr in Deutschland leben, können wir Sie leider nicht mehr als Teilnehmer dieser Studie berücksichtigen. Falls Sie nicht weiter mit uns zusammenarbeiten wollen, schicken Sie kommentarlos eine Email an folgende Adresse: Ichmoechte.Nichtteilnehmen@med.uni-muenchen.de.

Bitte schicken Sie diese Email von dem Emailkonto aus, über das wir Sie angeschrieben haben. Wir versichern Ihnen, dass wir nach Erhalt Ihrer Absage, alle persönlichen Daten aus der Datenbank löschen werden, so dass Sie nicht mehr von uns hören werden.

Mit herzlichen Grüßen,

Prof. Dr. Till Roenneberg & Dr. Karla V. Allebrandt

Institut für Medizinische Psychologie
Ludwig-Maximilians-Universität München
Goethestr. 31.
80336 Munich
<http://www.euclock.org/>
<http://www.imp-muenchen.de>

7.5.2 Brief für Rekrutierung von Probanden für die GWAS



INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE PSYCHOLOGIE

Zentrum für Chronobiologie
Ludwig-Maximilians-Universität München

Prof. Dr.rer.nat. Dr.med.habil. Till Roenneberg

Institut für Medizinische Psychologie, Goethestraße 31, D-80336 München

Tel. &49-(0)89-2180-75-608
Fax &49-(0)89-2180-75-238
e-mail roenneberg@lmu.de

Teilnehmerinformation und Einverständniserklärung

für die Teilnahme an der Untersuchung:

„DIE GENETIK DER INNEREN UHR DES MENSCHEN“

Sehr geehrte Studienteilnehmerin, sehr geehrter Studienteilnehmer,

mit diesem Schreiben möchten wir Sie über die Details der Studie unterrichten. Falls Sie sich entscheiden, als freiwillige Versuchsperson mitzumachen, bitten wir Sie, Ihr Einverständnis per Email zu erklären.

Teilnehmerinformation

Unsere Schlafzeiten werden von zwei „Uhren“ kontrolliert: von der inneren, biologischen Uhr, die bestimmt, wann wir bereit sind zu schlafen oder aufzustehen, und von der äußeren, sozialen Uhr (z.B. dem Wecker). Je verschiedener diese beiden Uhren „ticken“, desto schwieriger kann es für Menschen sein, an allen Tagen genug Schlaf zu finden. Tierversuche und Untersuchungen am Menschen zeigen, dass das Schlafverhalten auch von Genen beeinflusst wird. Die Steuerung der inneren Uhr ist also eine angeborene Eigenschaft und deshalb individuell bei jedem Menschen. Wir versuchen mit dieser Studie und Ihrer Unterstützung nun genauer herauszufinden, welche Gene bestimmen, wie unsere Uhr tickt.

1. Warum haben wir Sie für diese Studie ausgewählt?

Durch unseren Fragebogen (den Sie bereits online ausgefüllt haben) konnten wir Daten erheben, die zeigen, dass Sie zu extremen Zeiten schlafen. Deshalb sind Sie ein besonders interessanter Kandidat für unsere Forschung. Sie können unsere Forschung dadurch unterstützen, indem Sie uns gestatten, eine Probe Ihres Speichels zu analysieren (siehe Punkt 4). Im Speichel sind nämlich Zellen mit Erbinformation enthalten. Indem Sie uns die Analyse der Erbinformation ermöglichen, helfen Sie uns die Gene zu finden, die für das Verhalten von extremen Früh- oder Spättypen bzw. Lang- oder Kurz-Schläfern verantwortlich sind.

2. Was machen wir mit Ihrer Speichelprobe?

In unserer Studie werden die Vorschriften zum Datenschutz strikt eingehalten. Sobald wir Ihre Speichelprobe erhalten haben, wird diese Probe kodiert. Somit kann Ihre Probe nur noch anhand eines vierstelligen Codes (eine fortlaufende Nummer) identifiziert werden. Das Erbgut aus den Zellen im Speichel wird am Institut für Medizinische Psychologie in München isoliert. Diese Daten werden ebenfalls kodiert und mit den Daten des zugehörigen, kodierten Fragebogens verknüpft. Eine

endgültige Anonymisierung der Daten findet nach dieser Verknüpfung der Fragebogendaten mit den jeweiligen Erbgutdaten statt. Dies bedeutet, dass Ihre persönlichen Daten vollständig gelöscht werden. Bei der darauf folgenden genetischen Analyse liegen dann nur noch die anonymen Codes zu den Daten vor. Das heißt, weder Ihr Name, noch Ihre Initialen, das Geburtsdatum, oder sonstige Angaben, die auf Ihre Person Rückschlüsse zulassen könnten, können bei der Auswertung oder bei einer Veröffentlichung der Studienergebnisse zugeordnet werden.

Um herauszufinden, welche Gene das Schlafverhalten beeinflussen, müssen wir das Erbgut sehr vieler Menschen analysieren und vergleichen. Das Erbgut von jedem Teilnehmer ist von größter Wichtigkeit, da wir es jeweils einem bestimmten Schlafverhalten zuordnen können. Dennoch stellt es in unserer Untersuchung einzig ein anonymes Datenpaar dar (zwischen Schlafverhalten und Erbgut-Sequenz). Wir versichern Ihnen, dass wir mit der von Ihnen bereitgestellten Erbgutinformation **NUR** den Zusammenhang zwischen Erbgut und Schlafverhalten untersuchen. Ihre (anonymisierte) Erbgutprobe wird nach Abschluss der Studie sofort vernichtet.

3. Nutzen der Studie

Sie selbst haben möglicherweise keinen unmittelbaren Nutzen von der Teilnahme an dieser Studie, außer dem möglichen Beweis, dass Ihre Tendenz zum frühen oder späten Aufstehen genetisch bedingt ist. Die erzielten Erkenntnisse sind jedoch für das Verständnis des Schlafverhaltens und auch im Hinblick auf das Behandeln und Heilen von Schlafstörungen und -krankheiten von großer Bedeutung.

4. Wie bekommen wir Ihre Speichelprobe?

Sobald wir Ihre Teilnahmebestätigung erhalten, werden wir Ihnen einen Behälter für Ihre Speichelprobe in einem frankierten Freiumschlag zukommen lassen. Ihre einzige Aufgabe ist dann entsprechend der beigefügten Gebrauchsanweisung Ihre Speichelprobe zu entnehmen und an uns zurückzuschicken.

Falls Sie sich entscheiden, an dieser Studie teilzunehmen, bitten wir Sie, die unten stehende EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG wörtlich zu kopieren und uns die Kopie davon per Email, ZUSAMMEN MIT IHRER VOLLSTÄNDIGEN ADRESSE, zu schicken.

Einverständniserklärung

Ich erkläre mich mit der Teilnahme an der Studie „**DIE GENETIK DER INNEREN UHR DES MENSCHEN**“ und mit der Erhebung und Verwendung persönlicher Daten und Befunddaten einverstanden. Ich verpflichte mich meine EIGENE Speichelprobe für diese Studie abzugeben. Ich behalte mir das Recht vor, jederzeit – auch ohne Angabe von Gründen – die Einwilligung zur weiteren Teilnahme zurückzuziehen.

Falls Sie sich entscheiden, an dieser Studie NICHT teilzunehmen, bitten wir Sie uns eine Email mit folgendem Inhalt in der Betreffzeile zu schicken:

„Ich möchte NICHT teilnehmen!“

Für Ihre Mühe, Ihre Unterstützung und Ihr Interesse bedanken wir uns sehr!

Herzliche Grüße,

Prof. Dr. Till Roenneberg (**Arbeitsgruppenleiter**)

Dr. Karla V. Allebrandt (**Projektleiterin**)

7.5.3 Aufklärungs- und Einwilligungsbrief an die Teilnehmer



INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE PSYCHOLOGIE

Zentrum für Chronobiologie
Ludwig-Maximilians-Universität München

Prof. Dr.rer.nat. Dr.med.habil. Till Roenneberg

Institut für Medizinische Psychologie, Goethestraße 31, D-80336 München

Tel. &49-(0)89-2180-75-608
Fax &49-(0)89-2180-75-238
e-mail roenneberg@lmu.de

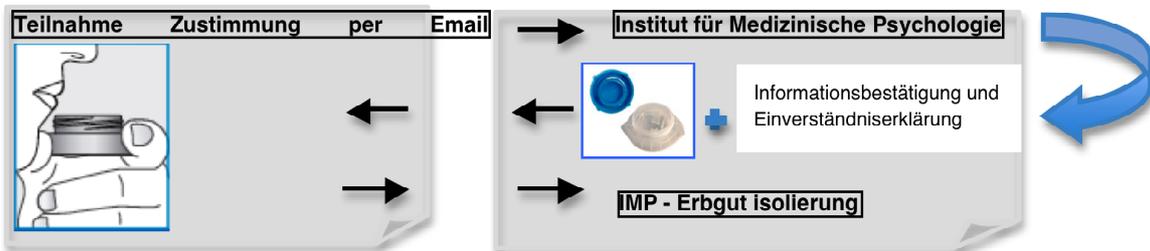
Teilnehmerinformation und Einverständniserklärung

für die Teilnahme an der Untersuchung:

„DIE GENETIK DER INNEREN UHR DES MENSCHEN“

Sehr geehrte Studienteilnehmerin, sehr geehrter Studienteilnehmer,

Sie erhalten dieses Schreiben, da Sie sich per Email dazu bereit erklärt haben, an unserer Studie teilzunehmen. Diesem Schreiben beiliegend finden Sie eine **Informationsbestätigung** und eine **Einverständniserklärung**, beides in jeweils doppelter Ausführung. Wir möchten Sie nun darum bitten, jeweils ein Exemplar der Informationsbestätigung und der Einverständniserklärung zu unterschreiben. Die doppelten Exemplare bleiben bei Ihnen für Ihre Unterlagen. Senden Sie uns die von Ihnen unterschriebenen Dokumente, zusammen mit Ihrer Speichelprobe (entsprechend der Gebrauchsanweisung des Behälters) in dem beigelegten Freiumschlag zurück (siehe Schema).



Wir haben Ihnen außerdem die **Teilnehmerinformation** beigelegt. Diese entspricht dem Informationsblatt, welches Sie per Email bereits im Vorfeld von uns erhalten haben.

Für Ihre Mühe, Ihre Unterstützung und Ihr Interesse bedanken wir uns sehr!

Herzliche Grüße,

Prof. Dr. Till Roenneberg (**Arbeitsgruppelleiter**)

Dr. Karla V. Allebrandt (**Projektleiterin**)

Informationsbestätigung:

Ich _____, geb. am _____
(Ihr Name in DRUCKSCHRIFT) (Geburtsdatum)

habe die vorangegangenen Seiten, auf denen mich Prof. Roenneberg und Dr. Allebrandt über das Wesen, die Ziele und die Tragweite der beschriebenen Untersuchung informiert, gelesen und alles verstanden.

Datum _____
(Ihre Unterschrift)

Einverständniserklärung

Ich erkläre mich mit der Teilnahme an der Studie „**DIE GENETIK DER INNEREN UHR DES MENSCHEN**“ und mit der Erhebung und Verwendung persönlicher Daten und Befunddaten einverstanden. Ich verpflichte mich meine EIGENE Speichelprobe für diese Studie abzugeben. Ich behalte mir das Recht vor, jederzeit – auch ohne Angabe von Gründen – die Einwilligung zur weiteren Teilnahme unwiderruflich zurückzuziehen.

Ich möchte Teilnehmen

Datum _____
(Ihre Unterschrift, falls Sie teilnehmen)

Ich möchte **NICHT** an dieser Studie teilnehmen:

Ich möchte NICHT Teilnehmen

Datum _____
(Ihre Unterschrift, **NUR** wenn sie **NICHT** teilnehmen möchten)

Versicherung

Hiermit versichern wir Ihnen, dass Ihre persönlichen Daten bei zurückgezogener Teilnahme aus unserer Datenbank vollständig gelöscht werden.

Allen Teilnehmern versichern wir, dass wir Ihre Erbgut-Daten nur anonymisiert und nur für die hier beschriebene Fragestellung verwenden werden. Alle persönlichen Daten werden vor der genetischen Analyse gelöscht.



Prof. Dr. Till Roenneberg (**Arbeitsgruppenleiter**)



Dr. Karla V. Allebrandt (**Projektleiterin**)

Zum Verbleib beim Studienteilnehmer

Informationsbestätigung:

Ich _____, geb. am _____
(Ihr Name in DRUCKSCHRIFT) (Geburtsdatum)

habe die vorangegangenen Seiten, auf denen mich Prof. Roenneberg und Dr. Allebrandt über das Wesen, die Ziele und die Tragweite der beschriebenen Untersuchung informiert, gelesen und alles verstanden.

Datum _____
(Ihre Unterschrift)

Einverständniserklärung

Ich erkläre mich mit der Teilnahme an der Studie „**DIE GENETIK DER INNEREN UHR DES MENSCHEN**“ und mit der Erhebung und Verwendung persönlicher Daten und Befunddaten einverstanden. Ich verpflichte mich meine EIGENE Speichelprobe für diese Studie abzugeben. Ich behalte mir das Recht vor, jederzeit – auch ohne Angabe von Gründen – die Einwilligung zur weiteren Teilnahme unwiderruflich zurückzuziehen.

Ich möchte Teilnehmen

Datum _____
(Ihre Unterschrift, falls Sie teilnehmen)

Ich möchte **NICHT** an dieser Studie teilnehmen:

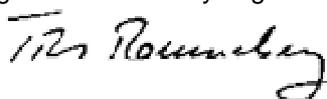
Ich möchte NICHT Teilnehmen

Datum _____
(Ihre Unterschrift, **NUR** wenn sie **NICHT** teilnehmen möchten)

Versicherung

Hiermit versichern wir Ihnen, dass Ihre persönlichen Daten bei zurückgezogener Teilnahme aus unserer Datenbank vollständig gelöscht werden.

Allen Teilnehmern versichern wir, dass wir Ihre Erbgut-Daten nur anonymisiert und nur für die hier beschriebene Fragestellung verwenden werden. Alle persönlichen Daten werden vor der genetischen Analyse gelöscht.



Prof. Dr. Till Roenneberg (**Arbeitsgruppelleiter**)



Dr. Karla V. Allebrandt (**Projektleiterin**)

Teilnehmerinformation

Unsere Schlafzeiten werden von zwei „Uhren“ kontrolliert: von der inneren, biologischen Uhr, die bestimmt, wann wir bereit sind zu schlafen oder aufzustehen, und von der äußeren, sozialen Uhr (z.B. dem Wecker). Je verschiedener diese beiden Uhren „ticken“, desto schwieriger kann es für Menschen sein, an allen Tagen genug Schlaf zu finden. Tierversuche und Untersuchungen am Menschen zeigen, dass das Schlafverhalten auch von Genen beeinflusst wird. Die Steuerung der inneren Uhr ist also eine angeborene Eigenschaft und deshalb individuell bei jedem Menschen. Wir versuchen mit dieser Studie und Ihrer Unterstützung nun genauer herauszufinden, welche Gene bestimmen, wie unsere Uhr tickt.

1. Warum haben wir Sie für diese Studie ausgewählt?

Durch unseren Fragebogen (den Sie bereits online ausgefüllt haben) konnten wir Daten erheben, die zeigen, dass Sie zu extremen Zeiten schlafen. Deshalb sind Sie ein besonders interessanter Kandidat für unsere Forschung. **Sie** können unsere Forschung dadurch unterstützen, indem Sie uns gestatten, eine Probe Ihres Speichels zu analysieren. Im Speichel sind nämlich Zellen mit Erbinformation enthalten. Indem Sie uns die Analyse der Erbinformation ermöglichen, helfen Sie uns die Gene zu finden, die für das Verhalten von extremen Früh- oder Spättypen bzw. Lang- oder Kurz-Schläfern verantwortlich sind.

2. Was machen wir mit Ihrer Speichelprobe?

In unserer Studie werden die Vorschriften zum Datenschutz strikt eingehalten. Sobald wir Ihre Speichelprobe erhalten haben, wird diese Probe kodiert. Somit kann Ihre Probe nur noch anhand eines vierstelligen Codes (eine fortlaufende Nummer) identifiziert werden. Das Erbgut aus den Zellen im Speichel wird am Institut für Medizinische Psychologie in München isoliert. Diese Daten werden ebenfalls kodiert und mit den Daten des zugehörigen, kodierten Fragebogens verknüpft. Eine endgültige Anonymisierung der Daten findet nach dieser Verknüpfung der Fragebogendaten mit den jeweiligen Erbgutdaten statt. Dies bedeutet, dass Ihre persönlichen Daten vollständig gelöscht werden. Bei der darauf folgenden genetischen Analyse liegen dann nur noch die anonymen Codes zu den Daten vor. Das heißt, weder Ihr Name, noch Ihre Initialen, das Geburtsdatum, oder sonstige Angaben, die auf Ihre Person Rückschlüsse zulassen könnten, können bei der Auswertung oder bei einer Veröffentlichung der Studienergebnisse zugeordnet werden.

Um herauszufinden, welche Gene das Schlafverhalten beeinflussen, müssen wir das Erbgut sehr vieler Menschen analysieren und vergleichen. Das Erbgut von jedem Teilnehmer ist von größter Wichtigkeit, da wir es jeweils einem bestimmten Schlafverhalten zuordnen können. Dennoch stellt es in unserer Untersuchung einzig ein anonymes Datenpaar dar (zwischen Schlafverhalten und Erbgut-Sequenz). Wir versichern Ihnen, dass wir mit der von Ihnen bereitgestellten Erbgutinformation **NUR** den Zusammenhang zwischen Erbgut und Schlafverhalten untersuchen. Ihre (anonymisierte) Erbgutprobe wird nach Abschluss der Studie sofort vernichtet.

3. Nutzen der Studie

Sie selbst haben möglicherweise keinen unmittelbaren Nutzen von der Teilnahme an dieser Studie, außer dem möglichen Beweis, dass Ihre Tendenz zum frühen oder späten Aufstehen genetisch bedingt ist. Die erzielten Erkenntnisse sind jedoch für das Verständnis des Schlafverhaltens und auch im Hinblick auf das Behandeln und Heilen von Schlafstörungen und -krankheiten von großer Bedeutung.

7.6 Oragene® DNA Isolierungsprotokoll

ORAGENE® DNA- ISOLIERUNGSPROTOKOLL

für die Isolierung von DNA aus **0,5 ml** Oragene/ Speichel Flüssigkeit

Notwendige Materialien:

- Mikrozentrifuge, die Zentrifugation bei 13 000 rpm (15 000 x g) ausführen kann
- Luft- oder Wasserinkubator für Temperaturen bis zu 50°C
- Ethanol (95 - 100%) bei Raumtemperatur
- DNA Puffer: TE 1x (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) oder ähnliches
- Glykogen (20 mg/ml)
- Ethanol (70%) bei Raumtemperatur
- Oragene DNA Purifier

Schritte:

1. Die Oragene/Speichel Flüssigkeit soll durch vorsichtiges Schütteln für einige Sekunden gemischt werden.
2. Inkubation bei 50°C für 1 Stunde in Wasserinkubator und für 2 Stunden in Luftinkubator
Dieser Schritt ist nur einmal durchzuführen und ist notwendig, um zu sichern, dass die DNA freigesetzt ist und, dass die Nukleasen dauerhaft inaktiviert sind.
3. **0,5 ml** von der Oragene / Speichel Flüssigkeit werden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (2,0 ml Reaktionsgefäß, wenn man 1ml Oragene/ Speichel Flüssigkeit isoliert) gegeben.
4. Man gibt 20 µl (1/25 vom Volumen der Probe) vom Oragene DNA Purifier und mischt am Rüttler für einige Sekunden
Die Flüssigkeit wird trüb wegen der Präzipitation von Inhibitoren und Verunreinigungen.
5. Inkubation in Eis für 10 Minuten
6. Zentrifugieren bei Raumtemperatur und 13 000 rpm (15 000 x g) für 3 Minuten.

7. Die klare Flüssigkeit (enthält DNA) oberhalb des Niederschlages wird mit einer Pipettenspitze gesaugt und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben.

5 µl Glykogen werden dazugegeben, um den DNA Niederschlag sichtbar zu machen.

Der Niederschlag (enthält Verunreinigungen) wird weggeworfen.

8. Zu der 500 µl Flüssigkeit gibt man 500 µl 95- 100 % Ethanol von Raumtemperatur. Die Lösung wird vorsichtig durch 10-mal Umdrehen gemischt.

Das Mischen mit Ethanol bewirkt eine Ausfällung der DNA.

9. Die Probe wird nun für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, damit die DNA vollständig ausfällen kann.

10. Zentrifugation bei Raumtemperatur, 13 000 rpm (15 000 x g) für 1 Minute.

11. Die klare Flüssigkeit oberhalb wird gesaugt und weggeworfen, ohne den DNA-Niederschlag zu berühren.

12. Hinzugeben zu dem DNA- Niederschlag von 250 µl 70% Ethanol. Die Probe wird 1 Minute bei Raumtemperatur gelassen, dann wird das Ethanol entfernt. Die Probe wird mit einem Papiertuch gedeckt, um die Kontamination zu verhindern und 30 Minuten an der Luft stehen gelassen. So kann das Ethanol restlos verdampfen.

Dieser Schritt ist optional zur Beseitigung von restlichen Inhibitoren.

13. Man gibt 100 µl DNA Puffer (z.B. 1x TE- Puffer) hinzu, um die DNA zu lösen. Die Mischung wird für mind. 5 Sekunden am Rüttler gemischt.

14. Die Probe wird 1-2 Tage am Rüttler oder am Tisch bei Raumtemperatur gelassen. So wird die vollständige Rehydratation der DNA ermöglicht. Erst nach dieser Zeit ist es sinnvoll die DNA Konzentration zu messen.

15. In TE- Puffer kann die DNA bei 4 °C bis zu 1-2 Monaten gelagert werden. Alternativ kann man Aliquoten bei – 20 °C langfristig lagern.

7.7 DNA Extraktion aus EDTA Blut

DNA Extraktion aus frischen EDTA – Blut

Tag 1

- Hinzufügen von 30 ml kaltem RBC – Pufferlösung zu 10 ml frischem EDTA – Blut
- Inkubation in Eis für 15 Minuten, währenddessen Umdrehen des Behälters mind. 4 mal
- Zentrifugieren für 10 Minuten bei 2500 rpm und 4°C
- Abschütten des Überstandes
- Hinzufügen von 10 ml kaltem RBC – Pufferlösung, der Niederschlag soll sich komplett auflösen
- Zentrifugieren für 10 Minuten bei 2500 rpm und 4°C
- Abschütten des Überstandes. Die Behälter sollen umgedreht auf einem Papiertuch belassen werden, damit die Pufferlösung abfließen kann
- Hinzufügen von 5 ml SE- Pufferlösung, der Niederschlag soll sich komplett auflösen
- Hinzufügen von 25 µl Proteinase K und 250 µl 20%-iger SDS- Pufferlösung
- Die Behälter sollen über Nacht auf dem Rüttler bei Raumtemperatur belassen werden

Tag 2

- Hinzufügen von 5 ml SE - Pufferlösung und Vermischen
- Inkubation für 5 Minuten bei 55°C
- Hinzufügen von 3 ml konzentriertem NaCl (6M)
- Intensives Mischen für 25 Sekunden
- Zentrifugieren für 15 Minuten bei 3500 rpm und Raumtemperatur. Danach sollten Niederschlag, klare Flüssigkeit und Schaum sichtbar werden
- Die klare Flüssigkeit wird in einen neuen Behälter übertragen
- Hinzufügen von der doppelten Menge der Probe 100%- igem Ethanol
- Nachdem die DNA ausgefällt hat, wird sie mit einer Pipette aus der Lösung entfernt
- Waschen in 70%- idem Ethanol
- Entfernen des Ethanols und Trocknen der DNA für 15-20 Minuten
- Auflösen der DNA in 1,5 ml TE (1x) Pufferlösung

Rezeptur für die Pufferlösungen

RBC – Puffer	NH ₄ Cl	155 mM	8,29g
(für 1L, autoklaviert)	KHCO ₃	20mM	1,00g
	Na ₂ EDTA	0,1 mM	0,034g
	pH 7,4		
SE – Puffer	NaCl	75mM	4,39g
(für 1L, autoklaviert)	Na ₂ EDTA	25mM	8,41g
	pH 8,0		
TE – Puffer 1x	Tris-HCl	10 mM	
(für 1L, autoklaviert)	EDTA	1mM	
	pH 8.0		

7.8 Gram – Färbung

Gram Färbung

1. Zur Herstellung einer Kristallviolett – Lösung werden 0,5 g Pulver in 100 ml destilliertem Wasser gelöst.
2. Eine kleine Menge von der zu untersuchenden Probe wird auf dem Objektträger gegeben und bei Raumtemperatur trockengelassen. Nach der Flüssigkeitsverdunstung werden die Objektträger 5-mal durch die Flamme geführt. Das Glas soll nicht heiß werden. Auf diese Weise werden die Zellen und die Bakterien auf dem Objektträger fixiert und werden bei der Färbung nicht ausgewaschen.
3. Die Objektträger werden für eine Minute in Kristallviolett - Lösung eingetaucht.
4. Die Objektträger werden dann mit Leitungswasser kurz (nicht länger als 5 Sekunden) gespült.
5. Dann werden sie in Grams Iodine Lösung für eine Minute eingetaucht.
6. Sie werden wieder mit Leitungswasser kurz gespült.
7. Es folgt eine Entfärbung in 95%igem Ethanol. Die Objektträger werden im Ethanol so lange stehengelassen, bis die blaue Farbe nicht mehr in die Lösung geht.
8. Es folgt wieder Spülung mit Leitungswasser.
9. Die Objektträger werden dann in eine Grams Fuchsin Lösung für 60 Sekunden getaucht und dann wieder mit Leitungswasser gespült.
10. Dann werden sie an der Luft trocknen gelassen.

7.9 Ethikantrag

Ethikantrag Projekt- Nr. 170-08

1 Allgemeine Angaben

1.1 Antragsteller und Kooperationspartner

Leiter der Arbeitsgruppe: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Till Roenneberg
Projektleiterin: Dr. Karla Viviani Allebrandt
LMU München, Institut für Medizinische Psychologie
Goethestr. 31, 80336 München

Telefon: +49 89 2180 75608 / -75654
Fax: +49 89 2180 75238
E-mail: roenneberg@lmu.de
karla.allebrandt@med.uni-muenchen.de

Mitarbeiter(innen): Astrid Bauer, Magdalena Zaharieva
Kooperationspartner: Prof. Thomas Meitinger
Dr. Peter Lichtner
Helmholtz Zentrum München, Neuherberg

2 Titel des Forschungsvorhabens

DIE GENETIK DER INNEREN UHR DES MENSCHEN.

3 Ausbildung und Prüferfahrung des Antragstellers

Projektleiter(in): siehe Lebensläufe von TR & KA in der Anlage. Der Antragsteller verfügt über langjährige Erfahrungen in epidemiologischen Studien und ist seit mehr als 30 Jahren auf chronobiologische Fragestellungen spezialisiert. Die Projektleiterin hat bereits ein vergleichbares Projekt in unseren Institut im Kooperation mit dem Institut für Human Genetik vom dem Helmholtz Zentrum München durchgeführt und verfügt über 5 Jahre Erfahrung in Populations-Genetik Studien.

4 Multizenterstudien

Die in den Richtlinien aufgeführten Punkte treffen auf diese Studie nicht zu.

5 Helsinki Erklärung

Der Antragsteller und alle Mitarbeiter des Projektes verpflichten sich, die Grundsätze der Deklaration von Helsinki mit ihren Novellierungen (von Tokio, 1975, Venedig, 1983, Hong Kong, 1989, Somerset West, 1996, und Edinburgh, 2000) in dieser Studie umzusetzen. Die Deklaration wird jedem Mitarbeiter(in) zu Beginn ihrer/seiner Tätigkeit ausgehändigt.

6 Bei studienbedingten Strahlenbelastungen

Die in den Richtlinien aufgeführten Punkte treffen auf diese Studie nicht zu.

7 Wissenschaftliche Angaben zum Forschungsvorhaben

7.1 Fragestellung/Studienziel

In Rahmen dieses Projektes soll die Assoziation zwischen Genotyp (DNA von Speichelproben) und dem Phänotyp von den Personen, die in der ursprünglichen Studie als extremer Chronotyp identifiziert wurden, in einer genomweiten Analyse untersucht werden. Ziel ist es, sowohl die aus Tierversuchen bekannten Uhrengene beim Menschen zu verifizieren als auch erstmals neue Uhrengene mit Hilfe der inneren Uhr des Menschen zu identifizieren. Da epidemiologische Ergebnisse einen Zusammenhang zwischen Chronotyp einerseits und Zigaretten- und Alkoholkonsum, Gesundheitszustand, Wohlbefinden, Schlafqualität, metabolischem Syndrom, Übergewicht, und Persönlichkeitsmerkmalen andererseits zeigen, werden diese Parameter auch in der hier geplante Studie per Fragebögen erhoben.

Beim Chronotyp handelt es sich um eine Eigenschaft deren Relevanz von der medizinischen Diagnostik und Therapie bis zur Planung von Schichtarbeit und zum Design wissenschaftlicher Studien reicht. In Tierversuchen und Untersuchungen am Menschen wurde gezeigt, dass der Chronotyp stark von genetischen Faktoren beeinflusst wird. Mutationen und Polymorphismen in allen bisher bekannten „Uhrengenen“ bestimmen (voraussagbar) den Chronotyp des Individuums (1; 2).

Eine Datenbank von 70,000 chronotypisierten Personen steht bereits zu Verfügung (3). Die Chronotyp Bestimmung wurde durch einen Fragebögen erfasst worden.

Es handelt sich um eine offene, methodisch lösbare Fragestellung.

7.2 Art der Studie

Es handelt sich um eine rein wissenschaftliche Studie zur genauen Quantifizierung verschiedenen Chronotypen. Diese sind sowohl Grundlage für nachfolgende genetische Untersuchungen, als auch ein wichtiger Beitrag zum Verständnis der Verteilung von Chronotypen in der Gesellschaft und im kulturellen Vergleich.

7.2.1 Forschungsvorhaben mit potentiellm Nutzen für den Teilnehmer

Entfällt.

7.2.2 Forschungsvorhaben ohne potentiellen Nutzen für den Teilnehmer

Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig und enthält keine Gefahren für die Probanden. Die Probanden mit extremen Chronotyp werden zunächst per E-Mail kontaktiert (N \cong 2500), indem sie die Möglichkeit erhalten, eine weitere Teilnahme abzulehnen, und ihre persönlichen Daten mit sofortiger Wirkung aus der Datenbank löschen zu lassen (siehe Text dieser Email im Anhang). Probanden, die sich auf dieser Stufe der Folgestudie bereit erklären, weiterhin teilzunehmen, erhalten einen Informationsbrief sowie eine Einverständniserklärung (siehe Anhang) per Post.

7.2.3 Forschung an körpereigenen Materialien/Gewebeentnahme für Studienzwecke

Die in den Richtlinien aufgeführten Punkte treffen auf diese Studie nicht zu.

7.3 Design der Studie

Studienplan (flow) und eingesetzten Fragebogen sind ebenfalls dem Anhang beigelegt.

Ziel unseres Forschungsprojektes ist die Identifizierung von Uhren-Genen beim Menschen die mit dem individuellen Chronotyp assoziiert sind. Die Studie wird auf einer Population von 2,500 extremen (deutschen) Chronotypen (aus der Gesamtpopulation von 70,000 chronotypisierten Personen) beruhen, die jeweils um eine freiwillige Speicherprobe gebeten.

Diese Studie wird in Kooperation mit dem Helmholtz Zentrum München durchgeführt (Prof. Thomas Meitinger), wo die DNA Proben mit Hilfe einer Illumina Plattform genomweit genotypisiert werden. Als weiterer Mitarbeiter des Helmholtz Zentrums wird Dr. Peter Lichtner an der Studie teilnehmen.

Der Antragsteller (TR) ist seit 1988 am der Institut für Medizinische Psychologie (IMP) tätig und ist Deutschlands erster Prof. für Chronobiologie. Die Projektleiterin (KA) untersucht seit August 2006 am IMP und am Helmholtz Zentrum (Institut für Humangenetik) den Zusammenhang zwischen Chronotyp und Genotyp im Rahmen des FP6 Projektes EUCLOCK. Als weitere Mitarbeiter am IMP sind Frau Magdalena Zaharieva (Doktorandin von der Medizinischen Fakultät) und Frau Astrid Bauer (Technisches Assistentin) an der Studie beteiligt.

Ziel der Fragebogenaktion ist es, einen repräsentativen Querschnitt der Bevölkerung bezüglich des Chronotyps und der Schlafgewohnheiten an Arbeitstagen und freien Tagen zu erhalten. Fragebögen sollen daher von möglichst vielen Menschen (unterschiedlichen Alters, verschiedene Berufssparten, verschiedene geographische Gebiete und kulturelle Hintergründe, etc.) freiwillig beantwortet werden.

8 Diskussion der ethisch-rechtlich relevanten Probleme

Ethisch-rechtliche Probleme entstehen bei dieser Fragebogenaktion nicht, da die Anonymität in Bezug auf Auswertung und Veröffentlichung geregelt ist, und die Probanden über die genauen Schritte der Erfassung aufgeklärt werden. Auswertung und Veröffentlichung der Ergebnisse beruhen ausschließlich auf anonymisierten Daten. Die Probanden werden detailliert über die einzelnen Schritte der Studie aufgeklärt (siehe Punkt 9).

8.1 Nicht- Einwilligungsfähigkeit

Im Regelfall wird der Fragebogen an volljährige Personen ausgegeben, welche die Fragen freiwillig beantworten. Da diese Angaben anonym erfolgen, haben wir von einer Zustimmung der Betroffenen abgesehen.

8.2 Forschung an Minderjährigen

Da in unsere Studie auch Jugendliche befragt werden, ist ein entsprechender Hinweis auf Zustimmung der Erziehungsberechtigten aufgeführt.

9 Datenschutz

Da wir die Teilnehmer bitten Ihre Adresse anzugeben, wurden Maßnahmen getroffen, die eine Anonymität der Befragten bei Auswertung und Veröffentlichung der Daten gewährleisten. Wir werden eine irreversible Anonymität der Befragten vor der

Auswertung und Veröffentlichung der Daten gewährleisten. Das Deckblatt des Teilnehmerinformation und Einverständniserklärung enthält folgenden Text:

In unserer Studie werden die Vorschriften über den Datenschutz strikt eingehalten. Es werden persönliche Daten über Sie erhoben und gespeichert. In jedem Fall sind alle Personen, die Zugang zu Ihren Daten haben, gesetzlich verpflichtet, Ihre Daten absolut vertraulich zu behandeln, eine Weitergabe an Dritte erfolgt nicht.

Alle Befunde dieser Untersuchung dienen ausschließlich Studienzwecken und werden in verschlüsselter Form aufbewahrt. Das heißt, weder Ihr Name noch Ihre Initialen oder das Geburtsdatum erscheinen im Verschlüsselungscode. Nur der Leiter unserer Arbeitsgruppe, Prof. Till Roenneberg, kann Einsicht in die persönlichen Daten nehmen. Eine Weitergabe ins In- und Ausland erfolgt nur in verschlüsselter Form und dient ausschließlich statistischen und wissenschaftlichen Zwecken. Auch in etwaigen Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit Ihrer persönlichen Daten gewährleistet.

Speichelproben werden am IMP verschlüsselt und so pseudonymisiert an das Helmholtz Zentrum geschickt.

10 Versicherung

Entfällt.

11 Finanzierung

Porto und Kopierkosten werden durch den EU Projekt EUCLOCK bezahlt. Ein Forschungsantrag für die Finanzierung der Studien wird zum DFG gestellt.

Die Teilnahme am der Fragebogenaktion sowie die Zusendung vom Speichelproben wird nicht honoriert.

Alle Probanden erhalten eine detaillierte Aufklärung (Antwort PDF) über ihren individuellen Chronotyp und wie sich dieser zur Gesamtbevölkerung verhält (in Anhang).

12 Literatur

1. Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinz WA, Virshup DM, Ptacek LJ, Fu YH. An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* 2001; 291:1040-1043.
2. Xu Y, Padiath QS, Shapiro RE, Jones CR, Wu SC, Saigoh N, Saigoh K, Ptacek LJ, Fu YH. Functional consequences of a CKI δ mutation causing familial advanced sleep phase

syndrom. Nature 2005; 434:640-644.

3. Roenneberg T, Kumar CJ, Merrow M. The human circadian clock entrains to sun time.

Curr. Biol. 2007; 17:R44-R45.

München, 06.06.2008.

Mit der Vorlage bei der Ethikkommission einverstanden:



Prof. Dr. Till Roenneberg
Leiter des Chronobiologie Arbeitsgruppe



Dr. Karla V. Allebrandt
Leiterin der Studie

8. Danksagung

Ein großer Dank geht an Karla Allebrandt PhD, für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit in ihrer Arbeitsgruppe promovieren zu dürfen. Ihre gute Betreuung und ihr fachliches Wissen haben zum Gelingen dieser Arbeit sehr beigetragen.

Ich möchte meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Till Roenneberg, besonders danken für seine Hilfsbereitschaft, sowie allen Mitarbeitern im Chronobiologie-Team für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Herzliches Dankeschön auch an meinem Kollegen Svilen Stoyanov für die Unterstützung bei der Laborarbeit.

Abschließend danke ich ganz besonders meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben und die immer für mich da sind. Благодаря!