

**Charakterisierung der lichtinduzierten Arrhythmie
des circadianen Systems beim
Dsungarischen Zwerghamster (*Phodopus sungorus*)
auf physiologischer und molekularer Ebene**

**Vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades**

**Doktor der Naturwissenschaft
Dr. rer. nat.**

**genehmigte Dissertation
von
Dipl.-Biol. Henning Voigt
geboren am 13.01.1973 in Hannover**

Hannover 2003

Referent: Prof. Dr. Stephan Steinlechner
Institut für Zoologie, Tierärztliche Hochschule Hannover

Korreferent: Prof. Dr. Klaus Wächtler
Institut für Zoologie, Tierärztliche Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 31. Januar 2003

Datum der Veröffentlichung: 07. Februar 2003

Zusammenfassung

Der Dsungarische Zwerghamster (*Phodopus sungorus*) ist ein kleines Nagetier, das zur Adaption an seinen sibirischen Lebensraum eine ausgeprägte Anpassung an die Jahreszeiten zeigt. Sie wird durch Komponenten des circadianen Systems gesteuert: Die Veränderung der Tageslänge wird als Zeichen der jahreszeitlichen Veränderung wahrgenommen. Auf molekularer Ebene lässt sich dies durch eine Veränderung im Expressionsmuster der Uhrgene *Per1* und *Per2* im SCN (*Nucleus suprachiasmaticus*) sehen: Bei verkürzter Hellphase ist die Dauer der erhöhten Expression deutlich kürzer und ihre Phasenlage zueinander verschiebt sich.

Unter Laborbedingungen lässt sich die circadiane Rhythmik eines Teils der Dsungarischen Zwerghamster durch die Gabe zweier Lichtpulse in aufeinander folgenden Nächten aufheben. Dies geschieht sogar, wenn der für Säugetiere wichtigste Zeitgeber, der Licht-Dunkel-Wechsel noch vorhanden ist. Diese Arrhythmie ist reversibel und lässt sich durch die Bereitstellung eines Laufrads aufheben. In dieser Arbeit konnte durch den Vergleich verschiedener Zuchtlinien gezeigt werden, dass es für die lichtinduzierte Arrhythmie einen genetischen Hintergrund geben muss.

Da postuliert wird, dass *Per1* und *Per2* als Komponenten des M-(morning)-, bzw. des E-(evening)-Oszillators die zwei Hauptkomponenten der circadianen Rhythmik beeinflussen, ist ihr Expressionsmuster von großer Aussagekraft für die molekularen Vorgänge der circadianen Rhythmik. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression der beiden untersuchten Uhrgene bei arrhythmischen Tieren nicht wie bei rhythmischen Tieren mit dem Hell-Dunkel-Wechsel synchronisiert ist. Es traten aber alle Stufen der Expression auf, so dass ein Freilauf zu vermuten ist. Da ein gekoppelter Freilauf beider Gene zu einem Freilauf des Tieres führen müsste, ist die resultierende Annahme, dass der M- sowie der E-Oszillator entkoppelt sind und gegenseitig die durch sie vermittelten Aktivitätsphasen unterdrücken. Warum sie sich nicht durch Licht, wohl aber durch Aktivität wieder synchronisieren lassen, sollte durch die Untersuchung des im SCN freigesetzten Neuropeptid Y (NPY) festgestellt werden.

Weder für die rhythmischen noch für die arrhythmischen Tiere konnte ein Tagesgang im immunhistologischen Signal gegen NPY festgestellt werden. Dies lag nicht an einem immer gleich hohen Signal, sondern an einer hohen Streuung der Werte zu allen Zeitpunkten. Die Bedeutung der NPY-Ausschüttung im SCN für dieses Modell wird erst durch Erfassen des immunhistologischen Signals gegen NPY bei Tieren mit Laufrad geklärt werden können.

Schlagworte: Arrhythmie, *Phodopus sungorus*, Uhrgene

Summary

The Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*) is a small rodent, which shows a strong adaptation to seasonal influences in response to its Siberian habitat. This adaptation is controlled by the circadian system and changes in daytime length are used as environmental signals for seasonal changes. This can be seen in a change of expression patterns of the clock genes *Per1* and *Per2* in the SCN, i.e. a shorter daytime decreases the duration of high *Per1* and *Per2* expression and changes their phase-relationship.

Under controlled conditions circadian rhythms can be abolished in a subpopulation of Djungarian hamsters using two light pulses in consecutive nights. This arrhythmia is shown despite the presence of a strong Zeitgeber, the light-dark cycle. In contrast, arrhythmic animals obtain a normal rhythm again when they are allowed access to a running wheel. In the present study it could be shown from the comparison of different strains of Djungarian hamsters that there exists a genetic background for the light pulse induced arrhythmia.

Per1 and *Per2* are considered as parts of the M-(morning)- and E-(evening)-oscillator, respectively, therefore the expression patterns of these two genes are of great importance for the molecular mechanism of circadian rhythm. It was possible to show that the expression of both clock genes is not synchronized with the light-dark cycle in arrhythmic animals. Interestingly, all steps of expression could be detected in these animals suggesting free-running of the gene expression. If the free-running of *Per1* and *Per2* would be coupled to each other the animal had to show free-running activity. Therefore the working hypothesis is that the M- and E-oscillators are uncoupled and depress each other's output.

Furthermore, the investigation focused on a possible role of NPY in the SCN, addressing the question, why arrhythmic animals can be synchronized again by activity but not by light.

No day-night difference in the expression of NPY could be detected in rhythmic and arrhythmic animals due to a high variation in the signal within the two groups. Therefore, a possible role of NPY in the SCN needs to be further investigated in animals having access to a running wheel.

Key words: arrhythmia, clock genes, *Phodopus sungorus*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Circadiane Systeme	1
1.2	Der Dsungarische Zwerghamster (<i>Phodopus sungorus</i>).....	1
1.3	Der Sitz der inneren Uhr des Säugetiers	3
1.3.1	Anatomie und Physiologie des SCN	4
1.3.1.1	Endogener Rhythmus der spontanen elektrischen Aktivität	4
1.3.1.2	Ausgehende Signale	4
1.3.1.3	Eingehende Signale	5
1.3.2	Wirkung von Zeitgebern	6
1.3.2.1	Lichtpulse	6
1.3.2.2	Nicht-photische Pulse.....	7
1.3.2.3	Fehlen von Zeitgebern.....	8
1.3.3	Molekulare Grundlagen des circadianen Systems.....	9
1.4	Fragestellung	10
2	Material und Methoden	13
2.1	Versuchstiere	13
2.2	Gehirnpräparation und Anfertigung von Gehirnschnitten.....	14
2.3	Prinzip der <i>in situ</i> -Hybridisierung	14
2.4	Herstellung eines cDNA-Klons.....	15
2.4.1	RNA-Isolierung.....	15
2.4.2	RT-PCR.....	16
2.4.3	Klonierung des cDNA-Fragments.....	17
2.4.4	Sequenzierung der cDNA-Klone.....	18
2.5	Herstellung radioaktiver RNA-Sonden (nach ALBRECHT et al. 1998)	19
2.5.1	Transformation von Bakterien.....	19
2.5.2	Anzucht von Bakterien	19
2.5.3	Präparation von Plasmid-DNA.....	20
2.5.4	Restriktion von Plasmid-DNA	20
2.5.5	<i>In vitro</i> -Transskription	21
2.6	Protokoll der radioaktiven <i>in situ</i> -Hybridisierung (nach ALBRECHT et al. 1998).....	22
2.6.1	Vorbehandlung der Gewebeschnitte	22
2.6.2	Hybridisierung.....	22

2.6.3	Posthybridisierung.....	23
2.6.4	Detektion der Hybride <i>in situ</i>	23
2.7	Immunhistochemie für NPY (nach HSU et al.1981)	24
2.8	Aktivitätsregistrierung.....	25
2.9	Tiermodell der lichtinduzierten Arrhythmie (nach STEINLECHNER et al. 2002)	25
2.10	Auswertung und Statistik	26
3	Ergebnisse	30
3.1	Untersuchung des Tiermodells.....	30
3.1.1	Ausbeute an lichtinduziert arrhythmischen Tieren	30
3.1.2	Unterschiede zwischen rhythmischen und arrhythmischen Tieren.....	33
3.1.3	Unterscheidung der Zuchtlinien	36
3.1.3.1	Morphologische und zuchtbedingte Unterscheidung der Zuchtlinien ...	36
3.1.3.2	Unterscheidung der Zuchtlinien im Tiermodell.....	38
3.1.4	Differenzierte Bewertung der Aktogramme.....	40
3.2	RT-PCR.....	47
3.3	Untersuchungen mittels <i>in situ</i> -Hybridisierung	48
3.3.1	<i>Per1</i> -Expression bei rhythmischen Tieren	48
3.3.2	<i>Per1</i> -Expression bei arrhythmischen Tieren.....	52
3.3.3	Vergleich der <i>Per1</i> -Expression bei rhythmischen und arrhythmischen Tieren.....	54
3.3.4	<i>Per2</i> -Expression bei rhythmischen Tieren	57
3.3.5	<i>Per2</i> -Expression bei arrhythmischen Tieren.....	60
3.3.6	Vergleich der <i>Per2</i> -Expression bei rhythmischen und arrhythmischen Tieren.....	63
3.4	Immunhistologischer Nachweis von NPY	66
3.4.1	Bei rhythmischen Tieren	66
3.4.2	Bei arrhythmischen Tieren	69
3.4.3	Vergleich der rhythmischen und arrhythmischen Tiere	71
3.5	Vergleich der histologischen Ergebnisse mit der Aktivität.....	73
3.5.1	<i>Per1</i> -Expression vs. Aktivität	73
3.5.2	<i>Per2</i> -Expression vs. Aktivität	75
3.5.3	NPY vs. Aktivität	77

4	Diskussion.....	80
4.1	Material und Methoden	81
4.2	Ausbeute an lichtinduziert arrhythmischen Tieren	82
4.3	<i>Per1</i> -Expression	84
4.4	<i>Per2</i> -Expression	85
4.5	NPY	86
4.6	Vergleich der Aktivität mit der Histologie.....	88
4.7	Schlussfolgerungen	88
4.8	Ausblick.....	89
5	Zusammenfassung.....	91
6	Summary	92
7	Literaturverzeichnis.....	93
8	Anhang	106
8.1	Material	106
8.1.1	Substanzen und Kits	106
8.1.2	Lösungen und Puffer, die nicht in Kits enthalten sind	110
8.1.2.1	Zu 2.2.....	110
8.1.2.2	Zu 2.4.....	110
8.1.2.3	Zu 2.5.....	111
8.1.2.4	Zu 2.6.....	113
8.1.2.5	Zu 2.7.....	114
8.1.3	Geräte	115
8.1.4	Sonstiges Material	116

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex
cDNA	copy DNA
cpm	counts per minute
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DD	Dauerdunkel
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothritol
E-Oszillator	evening-Oszillator
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
g	Gramm
GHT	<i>Tractus geniculohypothalamicus</i>
IGL	<i>intergeniculate leaflet</i>
IR	Infrarot
kb	Kilo-Basenpaare
LB-Medium	Luria Bertani Medium, Zusammensetzung siehe Anhang
LD (x:y)	Lichtregime (Stunden mit Licht: Stunden ohne Licht)
LGN	<i>Corpus geniculatum laterale</i>
LL	Dauerlicht
M	Molar
M-Oszillator	morning-Oszillator
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
n	Anzahl von Tieren in einer Versuchsgruppe
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NPY	Neuropeptid Y
OD	optische Dichte

Abkürzungsverzeichnis

PB	Phosphatpuffer, Zusammensetzung siehe Anhang
PBS	Phosphat-gepufferte Saline, Zusammensetzung siehe Anhang
PFA	Paraformaldehyd, Zusammensetzung siehe Anhang
PVN	<i>Nucleus paraventricularis</i>
RHT	<i>Tractus retinohypothalamicus</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse-Transcriptase-Polymerase-Chain-Reaction
S1	die Stunde vor dem Zeitpunkt der späteren Tötung
S2	die Stunde nach dem Zeitpunkt der späteren Tötung
SCN	<i>Nucleus suprachiasmaticus</i>
SOC-Medium	Lösung, Zusammensetzung siehe Anhang
SSC	Lösung, Zusammensetzung siehe Anhang
SSP	Skeleton-Photoperiode
<i>tau</i>	Periodenlänge im Freilauf
TAE	Lösung, Zusammensetzung siehe Anhang
TEA	Lösung, Zusammensetzung siehe Anhang
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
VP	Vasopressin
ZL1-4	Zuchtlinie 1-4
ZT	Zeitgeber-Time (ZT 0 = Licht an)

1 Einleitung

1.1 Circadiane Systeme

Der durch die Rotation der Erde begründete Hell-Dunkel-Wechsel ist für die Lebewesen auf der Erde einer der wichtigsten abiotischen Faktoren. Dass es unterschiedliche Möglichkeiten gibt damit umzugehen, zeigt die bei Tieren übliche Einteilung in tag- und nachtaktiv. Auch bei Pflanzen kann man die Bewegung der Blätter dem Tagesgang zuordnen. Im Jahr 1729 wurde durch den Geologen de Mairan beobachtet, dass diese Blattbewegung auch in konstanter Dunkelheit stattfindet. Heute fällt dieses Phänomen in den Bereich der circadianen Rhythmik (circa – ungefähr, dies – Tag).

Circadiane Rhythmen müssen unter gleichbleibenden Bedingungen eine für das Individuum relativ konstante Periode (*tau*) von ungefähr 24 Stunden haben und sich durch Zeitgeber wie Licht- oder Temperatur-Änderungen mit dem 24-Stunden-Tag synchronisieren lassen (ASCHOFF 1960). Der Freilauf der Rhythmen unter konstanten Bedingungen zeigt, dass es sich bei der circadianen Rhythmik um einen endogenen Mechanismus handelt, der so genannten „inneren Uhr“. Die innere Uhr erlaubt es dem Tier, rechtzeitig auf die regelmäßigen Ereignisse des Tages wie Sonnenauf- und Sonnenuntergang zu reagieren (PITTENDRIGH und DAAN 1976a). So ist es den Tieren möglich, sich vor Feinden zu schützen oder Nahrungskonkurrenz zu vermeiden, indem sie nur nachts oder nur am Tag aktiv sind (CLAUDSLEY-THOMPSON 1960).

Eine Variabilität in der circadianen Rhythmik ist zudem nötig, um eine Anpassung an das sich im Verlauf des Jahres ändernde Lichtregime zu ermöglichen. Während in unseren Breiten nachtaktiven Tieren im Sommer nur etwa acht Stunden Dunkelheit zur Verfügung stehen, sind es im Winter 16 Stunden (PITTENDRIGH und DAAN 1976b). Diese „Beweglichkeit“ der inneren Uhr ist besonders entscheidend für Tiere, die wie der Dsungarische Zwerghamster eine deutliche jahreszeitliche Anpassung vollziehen.

1.2 Der Dsungarische Zwerghamster (*Phodopus sungorus*)

Der Dsungarische Zwerghamster (*Phodopus sungorus*) ist ein Tier, das durch deutliche saisonale Veränderungen z.B. bei Körpergewicht, Fellfarbe und Hodengröße für die Forschung interessant wurde (HELDMAIER et al. 1981; HOFFMANN 1973). Dabei lassen sich Wintertiere (Körpergewicht ~ 30 g, weißes Fell, kleine inaktive Gonaden) von Sommertieren (Körpergewicht ~ 40g, braunes Fell, große aktive Gonaden) unterscheiden.

Diese Anpassung ist für die Tiere von großer Bedeutung, um den harten sibirischen Winter überleben zu können (HELDMAIER und LYNCH 1986).

Bei der zentralen Rolle, die diese Anpassungen spielen, ist es erstaunlich, dass in Laborzuchten auch „Non-Responder“ (Tiere, die bei Verkürzen der Lichtphase nicht zu Wintertieren werden) auftreten (PUCHALSKI und LYNCH 1988). Für das Phänomen der „Non-Responder“ konnte durch Vergleich von Zuchtlinien aus Deutschland und den USA ein genetischer Hintergrund belegt werden (LYNCH et al. 1989). Dieser Unterschied zwischen Zuchtlinien führte dazu, dass am Institut für Zoologie in Hannover seit dem Erhalt von Wildfängen drei Zuchtlinien getrennt gehalten werden. Während eine Zuchtlinie auf diese Wildfänge aus dem Jahr 1998 zurück geht, haben zwei weitere ihren Ursprung in der länger etablierten Laborzucht des Zoologischen Instituts in Marburg. In eine der Zuchten, die auf Tieren aus der Marburger Zucht basiert, wurden Tiere der erstgenannten Zucht eingekreuzt.

Arbeiten zur circadianen Rhythmik der Dsungarischen Zwerghamster brachten zum Teil unerwartete Ergebnisse, die der zentralen Bedeutung der circadianen Rhythmik für den Dsungarischen Zwerghamster zu widersprechen schienen. Bei einer einmaligen Verschiebung des Lichtregimes um fünf Stunden (RUBY et al. 1996) wurden 10 % der Tiere sofort arrhythmisch und 80 % der Tiere zeigten Freilauf, obwohl weiterhin ein Licht-Dunkel-Wechsel vorhanden war. Weitere 28 % der Tiere, die Freilauf zeigten, wurden nach einigen Tagen arrhythmisch. Diese Arrhythmie zeigte sich durch Verlust der täglichen Temperaturschwankung und Aktivitätsverteilung. Arrhythmische Tiere können aber nicht nur durch eine Verschiebung des Lichtregimes herbeigeführt werden, sondern auch durch zwei Lichtpulse in aufeinander folgenden Nächten (STEINLECHNER et al. 2002). Dabei konnte ebenfalls gezeigt werden, dass nicht nur die circadiane Rhythmik der Körpertemperatur- und Aktivitäts-Schwankungen verloren geht, sondern auch die Melatonin-Synthese keinem Tagesgang mehr folgt. Die Arrhythmie trat bei 75 % der Tiere auf und blieb auch im Dauer-Dunkel bestehen, so dass ein Masking-Effekt (ein Verdecken der circadianen Rhythmik durch akute Reaktion auf äußere Reize) des Lichts ausgeschlossen werden konnte. Während einzelne Komponenten der circadianen Rhythmik wie die Aktivität auch ohne Beeinflussung des SCN (*Nucleus suprachiasmaticus* – siehe 1.3) verändert werden können (MASUBUCHI et al. 2000), ist bei den mindestens drei involvierten Komponenten in diesem Fall ein Mitwirken des SCN anzunehmen. STEINLECHNER et al. (2002) vermuten eine „Kollision“ des M- und E-Oszillators (siehe 1.3.2.3), die zur gegenseitigen Hemmung der vermittelten Aktivität

führt. Durch Versuche mit Laufrädern konnte gezeigt werden, dass zusätzliche Aktivität Arrhythmie verhindert und bereits durch Lichtpulse induzierte Arrhythmie wieder aufhebt.

1.3 Der Sitz der inneren Uhr des Säugetiers

Bei der Suche nach dem Sitz der inneren Uhr, also der Struktur, die den endogenen circadianen Rhythmus generiert, stieß man im Gehirn der Säugetiere auf den SCN (*Nucleus suprachiasmaticus*). Der SCN ist ein paarig angelegter Nucleus über dem optischen Chiasma beidseitig des dritten Ventrikels.

Durch Läsionsversuche von STEPHAN und ZUCKER (1972) sowie MOORE und EICHLER (1972) wurde gezeigt, dass die circadiane Rhythmik der Tiere durch die Zerstörung des SCN verloren geht. Damit war jedoch noch nicht bewiesen, dass es sich beim SCN um den Sitz der inneren Uhr handelt, denn der Verlust der Rhythmik hätte auch auf eine Unterbrechung des Signalwegs zurückgeführt werden können.

Bei Transplantationsversuchen mit Tieren, deren SCN zerstört worden war, konnte durch Einsetzen von fetalem SCN-Gewebe in den dritten Ventrikel die circadiane Rhythmik wieder hergestellt werden (LEHMAN und RALPH 1994). Irrtümlicher Weise wurde beschrieben, dass auch fetales Gewebe des optischen Cortex diesen Effekt bewirkt (GARCIA-HERNANDES et al. 1987). Allerdings wurden diese Versuche nur in Lichtregimen mit Hell- und Dunkelphasen - nicht unter konstanten Bedingungen - durchgeführt. Das lässt vermuten, dass es sich um einen Masking-Effekt (d. h. nicht das circadiane System betreffende Reaktionen auf äußere Reize) des Lichts handelt. Dies trat nämlich auch bei nicht gelungenen SCN-Transplantationen auf (BOER et al. 1993). Da nur SCN-Gewebe in der Lage ist, die circadiane Rhythmik der Tiere wieder herzustellen, ist eine zentrale Rolle des SCN für die innere Uhr bewiesen. Den endgültigen Beweis für die Vermutung, dass der SCN die zentrale Uhr der Säugetiere ist, brachten weitere Transplantationsversuche. Es gibt eine Goldhamstermutante, die als homozygotes Tier einen Freilauf mit einer Periode (*tau*) von ca. 20 Stunden hat (RALPH und MENAKER 1988). Bei Transplantationsversuchen wurde SCN-Gewebe dieser Tau-Mutante in den dritten Ventrikel SCN-läsionierter Tiere implantiert. Diese Tiere bekamen wieder einen circadianen Rhythmus, doch unterschied er sich von ihrem ursprünglichen etwa 24-stündigen Rhythmus: Die Tiere entwickelten entsprechend des Spendergewebes einen Freilauf mit einem *tau* von 20 Stunden. Auch im entgegengesetzten Fall oder dem Verwenden von heterozygoten Tieren (*tau* = 22 Stunden) ist immer das Spendergewebe

für die Periode des Freilaufs verantwortlich (RALPH et al. 1990). Dieser Beweis für die Funktion des SCN als Sitz der inneren Uhr wurde durch weitere Transplantationsversuche zwischen verschiedenen Genotypen (BOER et al. 1999) und artübergreifenden Transplantationen (SOLLARS et al. 1995) bestätigt.

Somit ist der SCN das Gebiet, welches bei Fragestellungen im Bereich der circadianen Forschung genauer betrachtet werden muss.

1.3.1 Anatomie und Physiologie des SCN

Der SCN muss in seiner Funktion als innere Uhr drei Merkmale aufweisen: Er muss erstens einen endogenen Rhythmus generieren, der sich zweitens durch Zeitgeber mit der Außenwelt synchronisieren lässt und der drittens an den restlichen Organismus weitergegeben wird.

1.3.1.1 Endogener Rhythmus der spontanen elektrischen Aktivität

Ableitungen vom isolierten SCN zeigen eine circadiane Rhythmik in der spontanen elektrischen Aktivität (BOS und MIRMIRAN 1990). Wenn die Zellen des SCN vereinzelt werden, zeigen sie individuelle circadiane Rhythmen in ihrer spontanen elektrischen Aktivität (WELSH et al. 1995). *In vitro*- und *in vivo*-Versuche zeigten, dass für die Synchronisation der Zellen keine synaptische Übertragung nötig ist (BOUSKILA und DUDEK 1993; EARNAST et al. 1991; SCHWARTZ et al. 1987; SCHWARTZ 1991; SHIBATA und MOORE 1993; WELSH et al. 1995). Die Gabe von Tetrodotoxin (einem Natrium-Kanal-Blocker) in den SCN bewirkt eine Arrhythmie im Trinkverhalten, ohne die Phase der Rhythmik des SCN zu beeinflussen (SCHWARTZ et al. 1987). Bei Ableitungen vom isolierten SCN wird die circadiane Rhythmik des Signals durch Gabe von Tetrodotoxin nicht beeinflusst (DE JEU et al. 1998). Somit ist für die Synchronisation der Zellen innerhalb des SCN keine synaptische Übertragung nötig, wohl aber für die Verbreitung des Signals aus dem SCN in den restlichen Körper.

1.3.1.2 Ausgehende Signale

Als ein ausgehendes Signal des SCN wurde Vasopressin (VP) identifiziert. Die VP-Konzentration in der Umgebung des SCN und in der Cerebrospinal-Flüssigkeit verändert sich im Tagesgang (KALSBECK et al. 1995; JOLKKONEN et al. 1988; KURISBRINK et al. 1987; REPERT et al. 1981; SCHWARTZ et al. 1983; SCHWARTZ et al. 1985; SECKL und LIGHTMAN 1987). Allerdings ist durch Versuche

mit künstlich konstant gehaltenen VP-Konzentrationen, die ohne Auswirkung auf den Schlaf/Wach-Rhythmus blieben, gezeigt worden, dass VP nicht das einzige „Zeit-Signal“ für das Gehirn ist (KURISBRINK et al. 1987).

Immunhistologische Arbeiten in Bezug auf VP kombiniert mit Läsionsversuchen und Tracing-Techniken, gaben Auskunft, auf welchen Bahnen das Signal des SCN verbreitet wird (HOORNEMAN und BUIJS 1982; WATTS 1991; WATTS et al. 1987). Die deutlichste Efferenz zieht vom SCN dorsal zur subparaventricularen Zone unter dem hypothalamischen paraventricularen Nucleus. Unter der Vielzahl weiterer Efferenzen sind auch solche zu Gebieten wie dem LGN (*Corpus geniculatum laterale*) und den Raphe-Kernen (*Nuclei raphe*), die wiederum den SCN innervieren (WATTS et al. 1987). Diese Projektionen dienen der Modulation vieler neuroendokriner und autonomer Funktionen (BUIJS et al. 1998).

Der bekannteste circadian gesteuerte neuroendokrine Prozess ist die Melatoninausschüttung des Pinealorgans. Das vom Pinealorgan ausgeschüttete Melatonin kann im Sinne einer negativen Rückkopplung wiederum die Aktivität der SCN-Neurone reduzieren (MASON und BROOKS 1988; SHIBATA et al. 1989). Die Melatonin-Konzentration stellt ein Signal zur Synchronisation von vielen zeitabhängigen physiologischen Prozessen wie Körpertemperatur, autonome endokrine Vorgänge und Schlaf-Wach-Rhythmus dar (STEINLECHNER 1992). Die Wirkung ist allerdings artspezifisch; so ist Melatonin für den Menschen als „Schlaf-förderndes Hormon“ beschrieben (ZHANG et al. 1998; ZHDANOVA et al. 1997; ZHDANOVA und WURTMAN 1997), während Melatonin für den Goldhamster unter anderem eine bedeutende Rolle im saisonalen Reproduktionsverhalten spielt (GOLDMAN und DARROW 1983; REITER 1993).

Die Verbindungen zwischen innerer Uhr und Organismus sind zahlreich. Dabei beeinflussen einzelne Komponenten wie die Melatoninausschüttung den Organismus vielfältig. Es ist jedoch erwiesen, dass es kein Ausgangssignal gibt, das zentral alle Elemente (z. B. Melatoninausschüttung, Aktivität und Körpertemperatur) der circadianen Rhythmik kontrolliert.

1.3.1.3 Eingehende Signale

Zur Synchronisation des endogen generierten Rhythmus im SCN mit der Außenwelt sind eingehende Signale nötig. Drei bedeutende Eingänge sind bekannt. Ein glutamaterges Signal erreicht den SCN von der Retina über den RHT (*Tractus*

retinohypothalamicus) (MOORE und LENN 1972; CAHILL und MENAKER 1989; LIOU et al. 1986), ein serotonerges Signal kommt von den Raphe Kernen (BOSLER und BEAUDET 1985; FRANCOIS-BELLAN und BOSLER 1992) und vom IGL (*intergeniculate leaflet*) des LGN (*Corpus geniculatum laterale*) wird das Signal über den GHT (*Tractus geniculohypothalamicus*) durch Neuropeptid Y (NPY) vermittelt (SWANSON et al. 1974). Hinzu kommen kleinere Innervationen vom Cortex, dem basalen Vorderhirn und dem Hypothalamus (MOGA und MOORE 1997). Der RHT übermittelt die Information über die Lichtverhältnisse an den SCN und andere Kerngebiete des Gehirns (MORIN 1994), z. B. an den IGL (PICKARD 1985; TREEP et al. 1995). Das Signal des RHT im SCN wird wahrscheinlich durch den serotonergen Einfluss der Raphe Kerne moduliert, da sich an den Enden der Axone Serotonin-Rezeptoren befinden (PICKARD 1996).

Für die im SCN gemessene Menge an NPY ergab sich für LD-Bedingungen je ein Maximum für den Hell-Dunkel- und den Dunkel-Hell-Wechsel. Im Dauerdunkel wurden keine Maxima gefunden (CALAZA et al. 1990; SHINOHARA et al. 1993a; SHINOHARA et al. 1993b). Der Bereich, in dem der GHT den SCN innerviert, überlappt sich mit dem Bereich der Innervation durch den RHT (STOPA et al. 1995). Hinzu kommt, dass der IGL durch Neuronen des selben retinalen Ganglions innerviert wird wie der SCN (PICKARD 1985; TREEP et al. 1995). Eine modulierende Funktion des IGL für die Reaktion des SCN auf das Licht-Signal ist somit höchst wahrscheinlich (siehe 1.3.2.2).

Während die Innervation des SCN durch RHT ausschließlich die Licht-Information vermittelt und das Signal, das den SCN von den Raphe Kernen erreicht, den Schlaf-Wach-Zustand des Tiere dokumentiert, ist in dem Signal des IGL neben der Licht-Information auch die Aktivität ein vermittelter Faktor.

1.3.2 Wirkung von Zeitgebern

1.3.2.1 Lichtpulse

Um den endogenen Rhythmus mit der Umwelt zu synchronisieren, muss das Signal eines Zeitgebers auf den SCN einwirken. Der bedeutendste Zeitgeber für Säugetiere ist das Licht. Um die Wirkung des Lichts auf die circadiane Rhythmik zu erfassen, gibt man Tieren im Dunkeln Lichtpulse. Dabei ist der Zeitpunkt des Lichtpulses von großer Bedeutung (PITTENDRIGH 1960). Am Anfang der subjektiven Nacht bewirkt ein Lichtpuls eine Verzögerung der Phase, d.h. die Aktivität nachtaktiver Tiere setzt in der nächsten subjektiven Nacht später ein als ohne Lichtpuls. Ein Lichtpuls am

Ende der subjektiven Nacht bewirkt hingegen eine Beschleunigung der Phase, d.h. die Aktivität eines nachtaktiven Tiers setzt früher ein. Lichtpulse am subjektiven Tag bleiben ohne Wirkung. Diese Reaktionen dienen der Synchronisation der circadianen Rhythmik mit dem Licht-Dunkel-Wechsel. Bleibt ein nachtaktives Tier bis in die Hellphase aktiv, wird die Phase seines Rhythmus durch das Tageslicht einmalig beschleunigt, so dass am nächsten Tag das Tier bei Beginn der Hell-Phase nicht mehr aktiv ist.

Untersuchungen am SCN zeigten für photische Reize einheitliche Effekte. Durch das glutamaterge Signal des RHT wird eine *C-fos* Expression (ARONIN et al. 1990; COLWELL und FOSTER 1992; EARNEST et al. 1990; KORNHAUSER et al. 1990; REA 1989; RUSAK 1990) und CREB-Phosphorylierung (GINTY et al. 1993) ausgelöst. Beide Signale sind für die Wirkung des Lichts auf die circadiane Rhythmik nötig (Wollnik et al. 1995) und bewirken einen Anstieg der Expression der beiden Uhrgene *Per1* und *Per2* (siehe 1.3.3).

1.3.2.2 Nicht-photische Pulse

Auch nicht-photische Reize wie erzwungene Bewegung im Laufrad oder durch Benzodiazepin-Injektionen, die bei Nagern Aktivität auslösen, können eine Phasenverschiebung bewirken (GANNON und REA 1995; JANIK und MROSOVSKY 1993; VAN REETH und TUREK 1989; WICKLAND und TUREK 1991). Nicht-photische Reize bewirken keine *C-fos* Expression (MEAD et al. 1992; ZHANG et al. 1993) und keine CREB-Phosphorylierung (SUMOVA et al. 1994).

Dem SCN können nicht-photische Reize durch zwei Kerngebiete vermittelt werden: zum Einen als serotonerges Signal der Raphe Kerne zum Anderen als NPY-Signal vom IGL. Dabei ist wahrscheinlich der serotonerg vermittelte Effekt (CUTRERA et al. 1994; PENEV et al. 1994; PENEV et al. 1995) auf Vorgänge beim Wecken begrenzt (SUMOVA et al. 1996), denn einen Einfluss auf eine Phasenverschiebung durch erzwungene Bewegung hat die Zerstörung des serotonergen Signals nicht (BOBRZYNSKA et al. 1996).

Das NPY-Signal vom IGL spielt bei den nicht-photischen Reizen eine größere Rolle, denn die Gabe von NPY in den dritten Ventrikel und die elektrische Stimulation des GHT bewirken Phasenverschiebungen, wie sie durch erzwungene Aktivität erzeugt werden (BIELLO et al. 1994). Die Gabe von NPY-Antikörpern verhindert hingegen die Phasenverschiebung durch erzwungene Aktivität (BIELLO 1995). Die Zerstörung des IGL unterbindet die Phasenverschiebung durch Benzodiazepin-Injektionen (MAYWOOD

et al. 1997) und erzwungene Aktivität (JANIK und MROSOVSKY 1994; WICKLAND und TUREK 1994). Für Goldhamster konnte zudem gezeigt werden, dass der IGL die Anpassung an ein verschobenes Lichtregime beeinflusst (JOHNSON et al. 1989; HARRINGTON 1997). NPY kann zudem beim Goldhamster auch die Effekte von Lichtpulsen *in vivo* verringern (WEBER und REA 1997) und *in vitro* die Reaktion auf Glutamat und Glutamat-Rezeptor-Agonisten schmälern (BIELLO et al. 1997; YANNIELLI und HARRINGTON 2001). Dabei zeigte NPY *in vitro* seine inhibierende Wirkung sowohl am Anfang als auch am Ende der subjektiven Nacht (BIELLO et al. 1997), während *in vivo* nur am Ende der Aktivitätsphase eine Reduktion der Phasen-Verschiebung erreicht wird (WEBER und REA 1997). Dies zeigt wie wichtig Untersuchungen am ganzen Tier sind, um biologische Vorgänge zu verstehen. Die Wirkung von NPY auf die molekularen Komponenten der inneren Uhr (siehe 1.1.5) ist wahrscheinlich in der Reduktion der Expression der Uhrgene *Per1* und *Per2* zu sehen (FUKUHARA et al. 2001). Dabei werden die beiden Gene unterschiedlich angesprochen (BREWER et al. 2002). Ob dies ein direkter Effekt ist, ist noch nicht geklärt; eindeutig ist aber die große Bedeutung des NPY-vermittelten Signals für das circadiane System.

1.3.2.3 Fehlen von Zeitgebern

Unter Laborbedingungen ist der Hell-Dunkel-Wechsel im Allgemeinen der einzige Zeitgeber. Durch Dauerdunkel (DD) und Dauerlicht (LL) kann den Tieren auch dieser Zeitgeber genommen werden und ein Masking durch das Lichtregime verhindert werden (siehe 1.3). LL bietet hierbei noch die interessante Möglichkeit, die Auswirkung von verschiedenen Lichtstärken zu untersuchen. Dabei reagieren tag- und nachtaktive Tiere unterschiedlich auf verschiedene Lichtstärken (ASCHOFF 1979). Nachtaktive Tiere haben bei zunehmender Lichtintensität verlängerte Phasen im Freilauf, während bei tagaktiven Tieren die Phase verkürzt wird. Von besonderem Interesse ist das Phänomen des „Splitting“, das bei nachtaktiven Tieren im LL mit hoher Intensität und bei tagaktiven Tieren im DD auftreten kann. Als „Splitting“ bezeichnet man das Zerfallen der circadianen Rhythmik in zwei Komponenten. Diese Komponenten gaben Anlass ein Morning(M)-Evening(E)-Modell zu postulieren (PITTENDRIGH und DAAN 1976b). Bei diesem Modell gibt es einen M-Oszillator, der für die Anpassungen der Rhythmik im Dunkel-Hell-Wechsel steht, und einen E-Oszillator, der die gleiche Aufgabe im Hell-Dunkel-Wechsel übernimmt. Die Bedeutung dieses Zwei-Oszillatoren-Modells liegt in der Möglichkeit, Jahreszeiten durch die Lage der E- zur M-Komponente zu kodieren.

Mittlerweile wurde für den Goldhamster gezeigt, dass das Splitting durch Phasenverschiebung der Aktivität des rechten und linken SCN begründet ist (DE LA IGLESIA et al. 2000). Für eine unterschiedliche Rolle des rechten und linken SCN bei der Anpassung an verschiedene Tageslängen gibt es bisher aber keine Hinweise. Heute wird das M-E-Modell auf molekularer Ebene postuliert (DAAN et al. 2001, siehe 1.3).

Bei der Suche nach dem Hintergrund für die Veränderung der Phasenlänge des Freilaufs bei veränderten Lichtstärken traf man wieder auf den IGL (PICKARD et al. 1987; HARRINGTON und RUSAK 1988; HARRINGTON 1997). Hierbei sind allerdings artspezifische Unterschiede vorhanden. So konnte für Ratten und Mäuse eine Bedeutung des IGL für die Periodenlänge im Dauerlicht ausgeschlossen werden (PICKARD 1994; EDELSTEIN und AMIR 1999a). Beim Goldhamster wurde zudem gezeigt, dass der IGL eine bedeutende Rolle bei der Anpassung an eine Skeleton-Photoperiode (SPP) hat (EDELSTEIN und AMIR 1999b). Die SPP ist ein Lichtregime, bei dem zweimal täglich ein Lichtpuls gegeben wird, um Tagesbeginn und Tagesende zu suggerieren. Naive nachtaktive Tiere sind in der Lage, sich an die SPP zu synchronisieren (PITTENDRIGH und DAAN 1976a; ROSENWASSER et al. 1983; STEPHAN 1983; DE-COURSEY 1986). Dies passt zum natürlichen Verhalten dieser Tiere, die die Hell-Phase meist in dunklen Bauten verbringen. Im Labor ermöglicht die SPP ein Arbeiten mit Zeitgebern bei minimaler Möglichkeit für Masking-Effekte durch den Zeitgeber. IGL-läsionierte Goldhamster stellten zwar während der Lichtpulse die Aktivität ein (Masking), synchronisierten aber nicht mit der SPP, sondern zeigten Freilauf (EDELSTEIN und AMIR 1999b).

Dies zeigt, dass der IGL von großer Bedeutung für die Synchronisation mit Zeitgebern sein kann. Sein Fehlen löst aber keine Arrhythmie, sondern Freilauf aus. Für das Modell der lichtinduzierten Arrhythmie bedeutet dies, dass nicht nur der IGL verantwortlich sein kann, sondern auch in den molekularen Komponenten der circadianen Rhythmik nach Veränderungen gesucht werden muss.

1.3.3 Molekulare Grundlagen des circadianen Systems

Lange Zeit waren die molekularen Mechanismen der circadianen Rhythmik unbekannt. Mit *Clock* wurde das erste Uhren-Gen des Säugetiers gefunden (VITATERNA et al. 1994). Mittlerweile sind mehrere Uhren-Gene bekannt, die an einem molekularen circadianen Rhythmus beteiligt sind. Da eine einzelne isolierte Zelle des SCN einen circadianen Rhythmus generieren kann (WELSH et al. 1995), muss sich der molekulare

Hintergrund für die circadiane Rhythmik durch Vorgänge in einer Zelle beschreiben lassen.

Die Uhren-Gene *Cry1*, *Cry2* (HSU et al. 1996; TODO et al. 1996; VAN DER SPEK et al. 1996), *Per1* (SUN et al., 1997; TEI et al., 1997) und *Per2* (ALBRECHT et al., 1997; SHERMAN et al., 1997; TAKUMI et al., 1998) werden durch ein Dimer der Proteine CLOCK und BMAL1 aktiviert (GEKAKIS et al. 1998). Dimere aus den Proteinen PER1, PER2, CRY1 und CRY2 verdrängen die CLOCK/BMAL1-Dimere und hemmen so ihre eigene Synthese (SHEARMAN et al. 2000).

Stark vereinfacht lässt sich der molekulare Hintergrund der circadianen Rhythmik durch einen Rückkopplungs-Kreislauf von Genexpression, Protein-Synthese, Hemmung der Genexpression durch die kodierten Proteine und Abbau der Proteine mit gleichzeitigem Neubeginn der Genexpression beschreiben. Die Synchronisation mit Zeitgebern soll vor allem durch die Promotorfunktion von phosphoryliertem CREB an den Uhrengenen stattfinden.

Per1 und *Per2* werden dabei verschiedene Bedeutungen zugeordnet. So ist *Per1* an der Reaktion auf Lichtpulse in der zweiten Hälfte und *Per2* an der Reaktion auf Lichtpulse in der ersten Hälfte der Dunkel-Phase beteiligt (Albrecht et al. 2001). Dies wurde durch das Verhalten von Knock-Out-Mäusen gezeigt: Mäuse, denen das Gen *Per1* fehlt, reagieren zwar auf Lichtpulse am Anfang ihrer Aktivitätsphase, sind aber scheinbar blind für Lichtpulse am Ende ihrer Aktivitätsphase. Für Tiere, denen das Gen *Per2* fehlt, konnte hingegen am Anfang der Aktivitätsphase keine Reaktion mehr ausgelöst werden, während sie bei der Reaktion auf Lichtpulse in der zweiten Hälfte der Aktivitätsphase den Wildtyp-Mäusen ähnelten. Bezogen auf das M-E-Modell wird damit *Per1* (zusammen mit *Cry1*) zu einem Teil des M-Oszillators, während *Per2* (mit *Cry2*) dem E-Oszillator zugeordnet werden kann (DAAN et al. 2001).

Durch die Untersuchung der *Per1*- und *Per2*-Expression kann die komplette Funktionalität des circadianen Systems erfasst werden.

1.4 Fragestellung

Aus dem aktuellen Stand des Wissens über das Modell der lichtinduzierten Arrhythmie im circadianen System des Dsungarischen Zwerghamsters und der circadianen Rhythmik der Säugetiere ergeben sich weitere Fragen. Die Fragestellungen beziehen sich hauptsächlich auf die Hintergründe für das Phänomen der lichtinduzierten

Arrhythmie. Diese Hintergründe sollen vor allem durch histologische Arbeiten am SCN aufgedeckt werden:

STEINLECHNER et al. (2002) vermuten, dass die Arrhythmie durch die „Kollision“ zweier Oszillatoren (M und E) bewirkt wird. Das M-E-Modell wie es von DAAN et al. (2001) postuliert wird, sieht die *Per1/Cry1*- und *Per2/Cry2*-Kreisläufe als zwei gekoppelte Oszillatoren der circadianen Rhythmik. Dies gab Anlass, die *Per1*- und *Per2*-Expression im SCN zu erfassen. Für das „Splitting“ wurde aber eine Phasenverschiebung des rechten und des linken SCN gezeigt. Daher wurde auch der Symmetrie des Signals Beachtung geschenkt. Da aber beim Entkoppeln des rechten und linken SCN die Aktivitätsphasen getrennt bestehen bleiben (= Splitting), ist eine Veränderung in der Expression der Uhrgene wahrscheinlicher. Die Verlängerung der Aktivitätszeit im Kurztag wird von einer verkürzten Dauer der *Per1*- und *Per2*-Expression begleitet (NUESSLEIN-HILDESHEIM et al. 2000). Eine Ausdehnung der Expressions-Zeit könnte somit bei einer Reduzierung der Aktivitätsphase auf Null genauso erwartet werden, wie eine Verschiebung der Phasen beider Oszillatoren.

Die große Bedeutung der Aktivität für das Modell wurde durch Laufradversuche nachgewiesen (STEINLECHNER et al. 2002). Dabei wurde gezeigt, dass Aktivitätserhöhung durch ein Laufrad die Arrhythmie aufhebt. Dies gab Anlass, die Expression der Uhrgene nicht nur in Verbindung mit der Tageszeit zu sehen, sondern sie auch mit der Aktivität zu dieser Zeit an den Tagen vor der Tötung zu vergleichen. Eventuell ist bei arrhythmischen Tieren so eine Abhängigkeit der Expression der Uhrgene von der Aktivität zu erkennen, die bei den einzelnen Individuen nicht an die gleichen Uhrzeiten gebunden ist.

Das Signal, das den SCN über den Aktivitätsstatus informiert ist NPY. Somit ist die immunhistologische Erfassung des Signals gegen NPY im SCN eine weitere Möglichkeit, Aufschluss über die Vorgänge bei der lichtinduzierten Arrhythmie des Dsungarischen Zwerghamsters zu erhalten. Ist bei den rhythmischen und den arrhythmischen Tieren ein Unterschied in dem immunhistologischen Signal gegen NPY zu erkennen, wäre dies ein Ansatz zu erklären, warum die Tiere erst bei deutlicher Aktivierung des Signals durch stärkere Aktivität mit dem Zeitgeber Licht synchronisieren.

Ein weiterer Teil der Fragestellungen bezieht sich auf die Charakterisierung des Tiermodells:

Um einen genetischen Hintergrund für die lichtinduzierte Arrhythmie zu erfassen, werden in dieser Arbeit verschiedene Zuchtlinien betrachtet, die sich in der Herkunft der ursprünglichen Zuchtpaare unterscheiden. Als wichtigstes Kriterium wurde die Ausbeute an arrhythmischen Tieren erfasst. Doch auch eine genauere Betrachtung der Aktivität nach den Lichtpulsen wurde für die verschiedenen Zuchtlinien getrennt ausgewertet.

Bisher wurde nur der Unterschied von arrhythmisch oder rhythmisch nach den Lichtpulsen beschrieben. Es gibt somit keine Aussage darüber, ob sich vorher schon Unterschiede in der Aktivität der Tiere zeigen. Daher wurde in dieser Arbeit die Aktivität zu den Zeitpunkten der späteren Lichtpulse und die Gesamtaktivität in den Tagen vor den Lichtpulsen untersucht.

2 Material und Methoden

Sämtliche verwendeten Lösungen, Materialien und Geräte sind im Anhang aufgeführt.

2.1 Versuchstiere

Für alle Versuche fanden ausschließlich Dsungarische Zwerghamster (*Phodopus sungorus*) aus eigener Zucht (Institut für Zoologie, Tierärztliche Hochschule Hannover) Verwendung, die als „Sommertier“ (siehe 1.2) zu erkennen waren. Es gab drei Auszucht-Zuchtlinien, bei denen immer Cousin und Cousine verpaart wurden. Die Zuchtlinien unterscheiden sich in der Herkunft der Ursprungstiere:

- eine Zuchtlinie (ZL1) stammt von sechs Wildfängen aus dem Jahr 1996 ab,
- eine weitere (ZL2) stammt von 15 Zuchtpaaren aus der Population des Instituts für Zoologie in Marburg ab, die 2000 an das Institut für Zoologie kamen,
- die dritte Zuchtlinie (ZL3) ist die seit 1992 vorhandene Gruppe des Instituts für Zoologie, die ebenfalls ihren Ursprung in der Marburger Zucht hatte, in die jedoch 1996 auch Wildtiere eingekreuzt wurden.

Eine vierte Zuchtlinie (ZL4) wurde durch Inzucht von Tieren der ZL3 eingeführt. Für die Inzucht wurden Tiere miteinander verpaart, die lichtinduziert arrhythmische Geschwister (siehe 2.9) hatten.

Zur Zucht wurden die Zuchtpaare im Naturtag in Makrolon-Käfige Typ III gesetzt. Die Nachzuchten wurden nach dem Absetzen am 21. Lebenstag einzeln in Makrolon-Käfigen Typ II gehalten. Die Käfig-Reinigung erfolgte wöchentlich. Als Einstreu dienten Sägespäne (Altromin, Lage). Zusätzlich zu Futterpellets (Altromin 7014, Altromin, Lage) und Leitungswasser, welches den Tieren *ad libitum* zur Verfügung stand, bekamen die Tiere jede Woche ein Achtel Apfel. Die Zuchtpaare bekamen zusätzlich dreimal wöchentlich einen Teelöffel Quark (20 % Fett). In den Tierräumen herrschte eine Temperatur von 21-23°C und eine Luftfeuchtigkeit von 50-60%. Das Lichtregime entsprach Langtagbedingungen (LD 16:08), d.h. die Lichtphase betrug 16 Stunden, die Dunkelphase 8 Stunden. Zusätzlich brannte 24 Stunden am Tag eine Dunkelkammerlampe (E27 PF7 12E, red; Philips, Hamburg) in den Versuchsräumen.

Das Alter der Tiere lag bei Versuchsbeginn zwischen einem Monat und einem Jahr. Das Verhältnis zwischen Männchen und Weibchen war ausgewogen.

2.2 Gehirnpräparation und Anfertigung von Gehirnschnitten

Zur Gewinnung der Gehirne ausgewählter Tiere wurden die Tiere in Ihrem Käfig mit CO₂ getötet. Für die transcardiale Perfusion mit einer Fixierlösung erfolgte zunächst die Eröffnung der Bauch- und Brusthöhle. Nach Freilegen des Herzens und Eröffnen des Perikards wurde eine Kanüle in die linke Herzkammer gestochen. Um ein Abfließen des Blutes und des Perfusats zu ermöglichen, wurde dann der rechte Vorhof eröffnet. Mittels einer Schlauchpumpe wurde das Blut des Körperkreislaufs für fünf Minuten mit einer 0,1 M phosphatgepufferten Saline (PBS, pH 7,4) (siehe Anhang) herausgespült. Anschließend wurde die Perfusion mit 100 ml einer 4%igen Paraformaldehydlösung (PFA, pH 7,4) (siehe Anhang) fortgesetzt. Lag der Zeitpunkt der Tötung in der Dunkelphase der Tiere, wurden die Tiere in schwachem Rotlicht (Dunkelkammerlampe E27 PF7 12E, red; Philips, Hamburg) getötet und ihnen anschließend eine lichtdichte Kappe über den Kopf gezogen, die dort bis zum Ende der Perfusion verblieb.

Nach Entnahme der Gehirne wurden diese über Nacht bei 4 °C in 50 ml 4%iger PFA (pH 7,4) nachfixiert. Zur Kryoprotektion wurden die Gehirne dann in 50 ml 30%iger Saccharoselösung bei 4 °C gelagert. Nachdem die Gehirne in der Saccharoselösung abgesunken waren, konnte die Aufarbeitung erfolgen. Mit Hilfe eines Mikrotom-Kryostaten (Microm, Walldorf) konnten bei -21 °C Objekttemperatur und 4 °C Gerätetemperatur 40 bzw. 50 Transversalschnitte von 25, bzw. 20 µm Dicke im Bereich des *Chiasma opticum* angefertigt werden. Dadurch wurde der gesamte SCN (*Nucleus suprachiasmaticus*) erfasst. Die so gewonnenen Schnitte wurden in 0,1 M Phosphatpuffer aufgefangen. Jeder vierte (Schnittdicke 25 µm) oder fünfte (Schnittdicke 20 µm) Schnitt wurde zu einer Serie zusammengefasst, so dass man vier bis fünf Serien mit etwa 10 Schnitten in einem Abstand von je 100 µm erhielt. Die Serien wurden bis zu ihrer Verwendung für die Immunhistologie oder die *in situ*-Hybridisierung in einer kryoprotektiven Lösung (siehe Anhang) gelagert. Dazu wurden die Schnitte einer Serie in 2 ml Microtubes gegeben, in die 1,7 ml kryoprotektive Lösung vorgelegt worden waren. Nach jeweils 90-minütiger Lagerung bei 4 °C und -20 °C wurden die Schnitte bei -80 °C gelagert und erst vor der weiteren Verarbeitung auf Objektträger aufgezogen.

2.3 Prinzip der *in situ*-Hybridisierung

Die *in situ*-Hybridisierung dient der Darstellung von Nukleinsäuren in Geweben („*in situ*“) mittels markierter Nukleinsäuresonden. Mit RNA-Sonden weist man die Expression eines Gens an einer Stelle im Gewebe nach. Grundvoraussetzung hierfür ist

der Besitz eines Teilstücks der exprimierten Sequenz. Entweder greift man auf eine vorhandene cDNA-Bank zurück oder man generiert durch eine Reverse-Transcriptase-Polymerase-Chain-Reaction (RT-PCR) dieses Teilstück selbst. In dem Kapitel „Herstellung radioaktiver RNA-Sonden“ wird beschrieben, wie die mit radioaktivem Schwefel (^{35}S) markierten RNA-Sonden, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, hergestellt werden. Das Protokoll zur radioaktiven *in situ*-Hybridisierung (2.6) umfasst vier grundsätzliche Schritte:

1. Die Vorbehandlung der Gewebsschnitte:

Durch die Vorbehandlung wird eine bessere Penetration der Sonde an den Ort der Hybridisierung erreicht und ein übermäßiges Hintergrund-Signal vermieden.

2. Die eigentliche Hybridisierung:

Eine ausreichende Menge an Sonde im geeigneten Milieu bei der optimalen Temperatur ermöglicht die Ausbildung von Hybriden aus Sonde und nachzuweisender Nucleotidsequenz.

3. Die Nachbehandlung oder auch Post-Hybridisierung:

Um die Spezifität zu erhöhen, werden in der Post-Hybridisierung unspezifische Bindungen durch Veränderungen des Milieus gelöst und überschüssige, nicht hybridisierte RNA-Sonden enzymatisch abgebaut.

4. Detektion der Hybride *in situ*:

Bei der radioaktiven *in situ*-Hybridisierung wird das Signal in Form reduzierter Silberkörner im Röntgenfilm und in einem Flüssigfilm, der auf die Objektträger gebracht wird, sichtbar.

2.4 Herstellung eines cDNA-Klons

Die Herstellung eines cDNA-Klons lässt sich in mehrere Schritte unterteilen:

- die Gewinnung von RNA des gewünschten Gens (im Gemisch mit anderer RNA);
- die RT-PCR zur Generierung von cDNA aus der RNA und anschließender Amplifikation der gewünschten Struktur durch geeignete Primer;
- den Einbau der amplifizierten cDNA in einen Vektor und
- die Vermehrung des Vektors in einem Bakterium.

2.4.1 RNA-Isolierung

Vor Beginn einer RT-PCR muss RNA isoliert werden. Hierzu wurde ein Dsungarischer Zwerghamster zum Zeitpunkt ZT 17 getötet und Gewebe (Niere,

Hypothalamus) entnommen. Das Gewebe wurde in einen Glas/Teflon-Homogenisator mit 2 ml per 100mg Gewebe RNazol™ B (TEL-TEST, INC., Friendswood, USA) homogenisiert. Nach Zugabe von Chloroform (1/10 des Volumens) wurde der Ansatz für 15 Sekunden geschüttelt, bevor er für fünf Minuten zum Inkubieren auf Eis gelegt wurde. Nachdem dieses Gemisch für 15 Minuten zentrifugiert (12000g, 4 °C) wurde, konnte die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt werden. Das Gefäß wurde nach Zugabe von Isopropanol (Verhältnis zum Überstand 1:1) wiederum 15 Minuten auf Eis gestellt und anschließend weitere 15 Minuten zentrifugiert (12000g, 4 °C). Das entstandene Pellet wurde mit 75%igem Ethanol (gleiches Volumen wie vorher Isopropanol) gewaschen und in 50µl H₂O/DEPC aufgenommen. Um die Konzentration zu bestimmen, wurde 1 µl entnommen und 1 : 200 verdünnt. Die optische Dichte (OD) wurde in einer 200 µl Küvette mit dem Photometer bestimmt. Die Konzentration konnte dann nach folgender Formel bestimmt werden:

OD bei 260nm x Verdünnung x 40 = RNA-Konzentration in ng/µl

2.4.2 RT-PCR

Die RT-PCR selbst besteht im Prinzip aus zwei getrennten Reaktionen: einerseits dem Ansatz mit dem Enzym Reverse Transcriptase zur Herstellung der First-Strand cDNA und andererseits aus einer PCR zur Amplifizierung der gewünschten cDNA mit spezifischen Primern. Beides wurde entsprechend der Anleitung der Superscript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (LIFE TECHNOLOGIES, Karlsruhe) durchgeführt.

1 - 5 µg der zuvor gewonnenen RNA und 500 µg Oligo (dT)₁₂₋₁₈ wurden mit H₂O/DEPC auf 12 µl aufgefüllt, für 10 Minuten auf 70 °C erhitzt und auf Eis gestellt. Dem Ansatz wurden dann 4 µl 5fach First Strand Buffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTP Mix zugefügt. Nach gründlicher Durchmischung des Ansatzes gab man 1 µl (200 units) Superscript™ II hinzu. Nach einer Inkubationszeit von 50 Minuten bei 42 °C, wurde das Enzym durch Erhitzen auf 70 °C für 15 Minuten inaktiviert.

Die PCR wurde mit einem Temperaturgradienten zwischen 56 und 65 °C beim Annealing gefahren. Es gab zehn Ansätze und die Annealing-Temperatur unterschied sich jeweils um 1 °C. Jedes PCR-Reaktionsgefäß (0,5 ml Microtubes) hatte folgenden Inhalt: 5µl 10fach PCR Puffer (siehe Anhang), 1,5 µl 50 mM MgCl₂, 1µl 10 mM dNTP Mix, je 0,5 µl Primer 1 und 2 (10 µM), 0,5 µl *Taq* DNA Polymerase (5 units/µl), 1µl cDNA (aus der oben beschriebenen Reaktion) und 40 µl H₂O. Im Perkin Elmer Thermocycler 9600 mit beheizbarem Deckel wurde folgendes Programm gefahren: 94 °C für zwei Minuten

und dann 35 Zyklen: 94 °C für 30 Sekunden, 56 – 65 °C für 30 Sekunden und 68 °C für eine Minute. Zum Abschluss wurden die 68 °C für 10 Minuten gehalten, bevor die Proben bis zur Entnahme auf 4 °C abgekühlt wurden. Das Vorhandensein eines PCR-Produkts wurde auf einem 1 %igem Agarosegel (TEA) überprüft, auf dem eine 100 Basenpaar-Leiter mitlief. Die angelegte Spannung betrug 100 V.

2.4.3 Klonierung des cDNA-Fragments

Klonierung ist die Einführung eines DNA-Fragments in einen Vektor, der die massenhafte Vermehrung dieses DNA-Fragments ermöglicht.

Zur Ligation wurden von einer positiven Probe 2 µl mit 2 µl H₂O und 1 µl pCR[®]-TOPO-Vektor für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Für die Transformation wurden wiederum 2 µl dieses Ansatzes zu einem Ansatz One-Shot-Cells TOP10 gegeben, der zuvor auf Eis aufgetaut worden war. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 90 Sekunden auf 42 °C erhitzt und anschließend nochmals für 2 Minuten auf Eis gelagert. 200 µl SOC-Medium wurden daraufhin den Zellen zugefügt, die dann 45 Minuten bei 37 °C inkubiert wurden. Je 50 µl der Zellsuspension wurden auf einer Ampicillin (10 mg/ml) Agarplatte ausplattiert und zur Vermehrung über Nacht 37 °C in den Brutschrank gestellt. Positive Klone wurden in 2 ml Luria-Bertani (LB)-Medium mit Ampicillin (10 mg/ml) über Nacht angereichert. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte mittels des QIAprep[®] Miniprep Kit. 2 ml Bakteriensuspension wurden zentrifugiert und das Pellet anschließend mit 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Puffer P2 zur Zellyse wurden die Proben achtmal vorsichtig invertiert und vier Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Präzipitation wurden 350 µl Puffer N3 hinzugefügt. Nach 10minütigem Zentrifugieren (13000 rpm) wurde der Überstand auf die Säulen des Kits geladen und für 1 Minute zentrifugiert. Nach Verwerfen des Filtrats wurde die Säule mit 0,75 ml Puffer PE geladen und für 60 Sekunden zentrifugiert. Es folgte nach Verwerfen des Filtrats zum gründlichen Entfernen des Puffers ein Zentrifugation für 60 Sekunden. Um die DNA aus der Säule zu eluieren, wurden 50 µl Puffer EB auf die Säule gegeben und eine Minute inkubiert, bevor man einen abschließenden Zentrifugationsschritt für eine Minute durchführte. Um die Konzentration zu bestimmen, wurde 1 µl des Eluats entnommen und 1 : 200 verdünnt. Die optische Dichte (OD) zu wurde in einer 200 µl Küvette mit dem Photometer bestimmt. Die Konzentration an Plasmid-DNA in der Probe ließ sich nach folgender Formel berechnen:

OD bei 260 nm x Verdünnung x 50 = DNA Konzentration in ng/μl

2.4.4 Sequenzierung der cDNA-Klone

Die Sequenzierungen wurden durchgeführt, um die Gesamtsequenz des Templats zu erhalten und um zu erfahren, in welchem Reading Frame die eingebauten Inserts im entsprechendem Plasmid vorlagen.

Bei der DNA-Sequenzierung wurde nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger gearbeitet. Dabei wurde ein cycle sequencing durchgeführt, so dass geringe DNA-Mengen für die Analyse ausreichten. Die Sequenzierung wurde mit dem Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix für ABI PRISM™-Systeme durchgeführt. Die DNA aus einer Minipräparation wurde direkt eingesetzt.

Der Sequenzieransatz unterscheidet sich von einem normalen PCR-Ansatz im Wesentlichen dadurch, dass Ersterer nur einen Primer und zusätzlich einen Mix der vier verschiedenen Fluoreszenz-markierten Didesoxyanaloga der Basen enthält. So wird die von dem Primer verlängerte Kette an der Stelle abgebrochen, an der ein Analogon der entsprechenden Base eingebaut wird, da dem Analogon die 3'-OH-Gruppe fehlt. Der Einbau der Didesoxynucleotide ist statistisch verteilt, so dass man durch ihren Einbau unterschiedlich lange DNA-Ketten erhält.

Zu diesem Zweck wurden 2,2 μl Premix, 250 ng denaturierte (2 Minuten 95 °C) DNA und 10 pmol Primer T7 mit H₂O auf 10 μl aufgefüllt. Im Elmer Thermocycler 9600 wurden dann 25 Zyklen des folgenden Protokolls gefahren: 96 °C für 10 Sekunden, 50 °C für fünf Sekunden und 60 °C für vier Minuten. Anschließend wurde der Ansatz auf 4 °C abgekühlt. Es folgte zur Aufreinigung eine Ethanol-fällung: Der PCR-Ansatz wurde mit 90 μl H₂O in 1,5 ml Microtubes überführt, in welche bereits 10 μl einer 3 M Natrium-Acetat-Lösung (pH 4,6) vorgelegt worden waren. Nach Zugabe von 250 μl 100 %igem Ethanol wurde der Ansatz 20 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und nach einem weiteren Waschschriff mit 250 μl 70%igem Ethanol wurde erneut für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals entfernt und das Pellet im Vakuumtrockner getrocknet. Das Pellet wurde dann in 2 μl Auftragspuffer (fünf Teile Formamid/ ein Teil 25 mM EDTA Farbstoff pH 8,0) aufgenommen. Dieser Ansatz musste zum Denaturieren noch für zwei Minuten auf 90 °C erhitzt werden, bevor die Proben auf das Gel des Sequenzers aufgetragen werden konnten.

2.5 Herstellung radioaktiver RNA-Sonden (nach ALBRECHT et al. 1998)

2.5.1 Transformation von Bakterien

Plasmide, die die Zielsequenz enthielten, mussten in Bakterien (kompetente *E. coli*) transformiert werden, um Plasmide in ausreichender Menge zu erhalten. Dazu wurden nicht die selbst hergestellten *Phodopus*-spezifischen Plasmide verwendet, sondern vorhandene *Mesocricetus*-spezifische Plasmide, die im überprüften Fall eine 100 %ige Homologie zur *Phodopus*-spezifischen Sequenz aufwiesen. Für die Transformation kamen wieder One-Shot-Cells TOP 10 zum Einsatz. Die *Per1*-Sequenz war in den pCR-Script[®]-Vector (Stratagene, Amsterdam, NL) eingebaut, während die *Per2*-Sequenz in dem pGen[®]-T Easy Vector (Promega GmbH, Mannheim) vorlag.

Für die Transformation wurden 500 ng Plasmid zu einem Ansatz One-Shot-Cells gegeben, der zuvor auf Eis aufgetaut worden war. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 90 Sekunden auf 42 °C erhitzt, um eine verbesserte Aufnahme der Vektoren durch die Bakterien zu erreichen, und anschließend für zwei Minuten auf Eis gelagert. 200 µl SOC-Medium wurden den Zellen zugeführt, die daraufhin 45 Minuten bei 37 °C inkubiert wurden. Je 50 µl der Zellsuspension wurden auf einer Ampicillin (10 mg/ml) Agarplatte ausplattiert und zur Vermehrung über Nacht bei 37 °C in den Brutschrank gestellt. Durch die Zugabe von Ampicillin konnte sichergestellt werden, dass nur Klone, die das Plasmid aufgenommen hatten, wachsen konnten. Die entstandenen Kolonien konnten auf dem Nährboden ohne Verlust ihrer Vermehrungsfähigkeit bis zu vier Wochen bei 4 °C gelagert werden. Eine Lagerung für längere Zeiträume wurde nicht praktiziert, da das Plasmid jeder Zeit erneut in Bakterien transformiert hätte werden können.

2.5.2 Anzucht von Bakterien

Die Gewinnung von cDNA in ausreichender Menge machte die weitere Vermehrung der Plasmid-tragenden Bakterien erforderlich. Hierfür wurden wiederum positive Klone in 2 ml Luria-Bertani (LB)-Medium mit Ampicillin (10 mg/ml) über Nacht bei 37 °C auf dem Rüttler angereichert. 10 µl dieser Starter-Kultur wurden in 500 ml LB-Medium mit Ampicillin (10 mg/ml) über Nacht bei 37 °C auf dem Rüttler inkubiert.

2.5.3 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung der Plasmid-DNA aus den Bakterien wurde die Bakterienkultur 10 Minuten bei 35000 rpm in der Ultrazentrifuge bei 4 °C zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde unter Verwendung eines Nucleobond® AX500-Kits präpariert.

Die pelletierten Bakterien wurden in 12 ml Puffer S1 resuspendiert und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 12 ml Puffer S2 wurde die Suspension, um die Lyse der Bakterien und damit das Freisetzen der Plasmide herbeizuführen, vier Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde anschließend zur Präzipitation mit 12 ml Puffer S3 versetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit (fünf Minuten auf Eis) wurde der Inhalt des Zentrifugenröhrchen über einen feuchten Papierfilter in ein frisches Zentrifugenröhrchen gegeben, um die gelöste Bakterien-DNA von den ungelösten Bestandteilen der lysierten Bakterienzellen zu trennen. Das Filtrat wurde auf die mit 4 ml Puffer N2 equilibrierte Nucleobond-Säule gegeben, wobei ausschließlich Plasmid-DNA an der Matrix der Säule gebunden wurde und damit eine Trennung von der übrigen Bakterien-DNA erzielt werden konnte. Nach dem zweifachen Waschen mit 16 ml Puffer N3 konnte die gebundene Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer N5 in ein Zentrifugenröhrchen eluiert werden. Das Eluat wurde zum Ausfällen der Plasmid-DNA mit 11 ml Isopropanol gemischt. Nach 30minütigem Zentrifugieren (15000 rpm bei 4 °C) wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 100 µl H₂O/DEPC aufgenommen und in ein 1,5 ml Microtube überführt.

2.5.4 Restriktion von Plasmid-DNA

Die Herstellung von RNA-Sonden für die *in situ*-Hybridisierung mittels *in vitro*-Transkription erforderte die Linearisierung des cDNA-haltigen Plasmids. Durch die Restriktion wurde das ringförmige Plasmid in die offene, linearisierte Form überführt, die der RNA-Polymerase den Bau der gewünschten Sonde erlaubt.

Die Restriktion der Plasmid-DNA erfolgte mit Restriktionsenzymen, die die Plasmid-DNA spezifisch kurz hinter dem Insert in der Plasmid-DNA schneiden. Für die Herstellung der Antisense-Sonden waren dies Not I für *Per1* in dem pCR-Script®-Vector (Stratagene, Amsterdam, NL) und Aat II für *Per2* in dem pGEM®-T-Easy-Vector (Promega GmbH, Mannheim).

10 µl Restriktionsenzym, 10µl 10fach Puffer (für Not I Puffer 3 und 1µl BSA und für Aat II Puffer 4) 30µg Plasmid-DNA wurden mit H₂O/DEPC auf 100µl aufgefüllt und

bei 37 °C über Nacht inkubiert. Auf einem 1%igen Agarose-Gel wurde überprüft, ob die Restriktion erfolgreich war.

Die linearisierte Plasmid-DNA wurde unter Verwendung des QIAquick PCR Purifikation Kit (Qiagen, Hilden) von Proteinen und Salzen gereinigt, um Störungen durch diese bei weiterer Verwendung der Plasmid-DNA zu vermeiden.

Zu dem 100 µl Ansatz wurden 500 µl Puffer PB gegeben. Damit wurde die QIAquick-Säule beladen und 60 Sekunden zentrifugiert (13000 rpm bei RT). Das Filtrat wurde verworfen und die Säule wurde mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen (Zentrifugation: 60 Sekunden, 13000 rpm, RT). Das Filtrat wurde erneut verworfen und die Säule zum Trocknen für eine Minute zentrifugiert (13000 rpm, RT). Zum Eluieren der Plasmid-DNA wurden 30 µl Puffer EB auf die Säule gegeben und nach einer Einwirkzeit von einer Minute erfolgte wiederum eine Zentrifugation. Man erhielt so 28 µl Eluat, von denen 2 µl zur Konzentrationsbestimmung verwendet wurden. Die Konzentration ließ sich nach oben genannter Formel ($OD \text{ bei } 260 \text{ nm} \times \text{Verdünnung} \times 50 = \text{Konzentration in ng/}\mu\text{l}$) berechnen.

2.5.5 *In vitro*-Transskription

Die Herstellung von mit radioaktiven Schwefel (^{35}S) markierten RNA-Sonden für die *in situ*-Hybridisierung erfolgte mittels *in vitro*-Transkription. Bei dieser Reaktion wurde unter Einsatz einer Vector-spezifischen RNA-Polymerase (T7 für *Per1* und SP6 für *Per2*) eine RNA-Sonde spezifischer Sequenz und Länge entlang einer linearisierten cDNA transkribiert. Die Markierung der Sonde konnte dadurch erreicht werden, dass ^{35}S markiertes UTP in die RNA eingebaut wurde.

Als Ansatz für die Reaktion wurden 7 µl H₂O/DEPC, 6 µl 5fach Transkriptionspuffer, 1 µg linearisierte Plasmid-DNA, 1,5 µl DTT, je 1 µl rATP, rCTP und rGTP, 1 µl RNase-Inhibitor, 10 µl radioaktiv markiertes UTP und 1 µl RNA-Polymerase in ein RNase-freies Microtube pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von drei Stunden bei 37 °C wurden 2 µl DNase 1 zugegeben und 15 Minuten inkubiert. Zur Aufreinigung der Sonde wurden 190 µl H₂O/DEPC, 10 µl tRNA (10 mg/ml, aus Hefe), 200 µl 4 M Ammonium-Acetat-Lösung und 1 ml 100%iges Ethanol dem Ansatz zugefügt. Alle Flüssigkeiten wurden zuvor mindestens eine Stunde auf Eis gelagert. Nach sorgfältigem Durchmischen des Ansatzes wurde dieser für sieben Minuten auf Eis gelagert, danach schloss sich eine Zentrifugation an (sieben Minuten, 4 °C und 13000 rpm). Der Überstand wurde in den radioaktiven Müll verworfen. Der Niederschlag wurde

in 200 µl H₂O/DEPC aufgenommen und nach Zugabe von 200 µl Ammonium-Acetat-Lösung und 1 ml 100%iges Ethanol wurde der Ansatz wie zuvor für sieben Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Niederschlag in 100 µl Hybridisierungs-Mix (siehe Anhang) aufgenommen. Um im Counter die Aktivität und damit die Menge an Sonde zu bestimmen, wurden 2 µl der Probe in 10 ml Scintillator-Cocktail gegeben. Eine alkalische Hydrolyse zur Fragmentierung der Sonde wurde nicht vorgenommen, da die kritische Größe für Sonden von 1 bis 1,5 kb nicht überschritten wurde.

2.6 Protokoll der radioaktiven *in situ*-Hybridisierung (nach ALBRECHT et al. 1998)

2.6.1 Vorbehandlung der Gewebeschnitte

Zur Vorbehandlung der auf Objektträger aufgezogenen Schnitte wurden diese in einem 24 Objektträger fassenden Objektträgerhalter untergebracht. Alle Flüssigkeiten, mit denen gearbeitet wurde, wurden in Plastikgefäße gegeben, die 250 ml fassten. Objektträgerhalter und Gefäße wurden in 1 M NaOH-Lösung RNase-frei gemacht und vor Gebrauch mit H₂O abgespült.

Nach zweimaligem 10minütigen Spülen mit Histoclear, wurde zweimal für zwei Minuten mit 100%igem Ethanol gespült. Einer absteigenden Alkoholreihe (95, 80, 70, 50, 30% Ethanol) für jeweils 20 Sekunden, folgten verschiedene Inkubationsschritte: fünf Minuten 0,9% NaCl-Lösung, fünf Minuten PBS und 20 Minuten 4%iges PFA zur Nachfixierung. Überschüssiges PFA wurde durch zweimaliges Spülen in PBS entfernt, bevor die Schnitte fünf Minuten in einer Lösung inkubiert wurden, die 20 µg/ml Proteinase K in 50 mM Tris/HCl 5mM EDTA (pH 8) enthielt. Es folgte ein Spülen mit PBS für fünf Minuten, bevor erneut mit 4%igem PFA für 20 Minuten nachfixiert wurde. Anschließend erfolgte eine 10minütige Acetylierung der Schnitte in einer 0,1 M TEA/HCl-Lösung (pH 8), der 600 µl Essigsäureanhydrid zu Beginn und nach vier Minuten hinzu gefügt werden. Nach zwei Waschsritten für je fünf Minuten in PBS und 0,9 % NaCl-Lösung wurde die Vorbehandlung der Gewebeschnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (30, 50, 70, 80, 95, 100 % Ethanol für je 20 Sekunden) beendet.

2.6.2 Hybridisierung

Die Sonde aus der *in vitro*-Transkription wurde mit Hybridisierungs-Mix auf eine Konzentration von 40.000 - 120.000 cpm/µl gebracht. Auf jeden Objektträger wurden 50

µl Hybridisierungs-Mix (2 - 6 Millionen cpm) gegeben. Die Lösung wurden auf den Objektträger pipettiert und mit der Pipettenspitze vorsichtig gleichmäßig verteilt, bevor ein Deckglas aufgelegt wurde. Die Objektträger wurden in feuchten Kammern, die bis zu acht Objektträger fassten, gelegt und über Nacht bei 58 °C inkubiert. Am Boden der feuchten Kammern befand sich ein mit 50 % Formamid und 2fach SSC getränktes Zellstofftuch.

2.6.3 Posthybridisierung

Die Objektträger wurden in einen Objektträgerhalter gestellt und 30 Minuten 5fach SSC mit 20 mM Mercaptoethanol bei 63 °C inkubiert. Nach zehn Minuten wurde damit begonnen, die Deckgläschen vorsichtig zu entfernen. Danach wurde eine weitere halbe Stunde in 2fach SSC mit 50 % Formamid und 40 mM Mercaptoethanol bei 63 °C inkubiert. Nach dreimaligem Spülen in NTE (siehe Anhang) für je 10 Minuten bei 37 °C wurde durch 20 µg/ml RNase A in NTE bei 37 °C die nicht hybridisierte RNA über 30 Minuten abgebaut. Nach 15minütigem Spülen in NTE bei 37 °C wurde erneut für 30 Minuten in 2fach SSC mit 50 % Formamid und 40 mM Mercaptoethanol (700 µl) bei 63 °C inkubiert. Bevor die Posthybridisierung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (30, 60, 80, 95 und zweimal 100 % Ethanol für je 30 Sekunden) endete, wurde noch je 15 Minuten mit 2fach und 0,1fach SSC gespült.

2.6.4 Detektion der Hybride *in situ*

Die Objektträger wurden mit Klebeband auf Plastikunterlagen fixiert und in Filmkassetten gelegt. In der Dunkelkammer wurden Autoradiographiefilme aufgelegt. Nach ein bis drei Tagen Wartezeit wurde der Film in der Dunkelkammer entnommen und in der Entwicklermaschine entwickelt. War kein deutliches Signal zu erkennen, wurde der Vorgang mit einer längeren Wartezeit wiederholt.

Anschließend wurden die Objektträger im Dunkeln mit Flüssigfilm beschichtet. Dazu mussten die Objektträger nacheinander für drei Sekunden in den auf 45 °C erwärmten Flüssigfilm getaucht werden. Zur Verbesserung des Signals wurde anschließend die Rückseite der Objektträger mit einem Zellstofftuch vom Flüssigfilm gereinigt, so dass dieser nur auf der Oberseite vorhanden war. Die Objektträger wurden über Nacht liegend in einer lichtdichten Box gelagert. Am folgenden Tag war der Flüssigfilm angetrocknet und die Objektträger wurden lichtdicht bei 4 °C gelagert. Die Belichtungszeit des Flüssigfilm betrug das dreifache der Belichtungszeit des aufgelegten

Autoradiographiefilms. Anschließend erfolgte die Entwicklung des Flüssigfilms. Dazu mussten die Objektträger für zwei Minuten in den Entwickler, für 30 Sekunden in Wasser, für fünf Minuten in Fixierer und für 10 Minuten in Wasser gegeben werden. Die gesamte Entwicklung wurde im Dunkeln durchgeführt. Die Schnitte wurden danach einer Kernfärbung mit Hoechst 33258 unterzogen. Die Objektträger wurden zu diesem Zweck direkt aus dem letzten Schritt der Entwicklung für zwei Minuten in 250 ml Wasser mit 2 µg/ml Hoechst 33258 eingetaucht. Nach zweiminütigem Waschen mit Leitungswasser trockneten die Objektträger an der Luft und wurden mit 50 µl Canada-Balsam in Methyl-Salicylat (5 g in 10 ml) eingedeckt. Die Objektträger mussten mindestens eine Woche liegend gelagert werden, damit das Eindeck-Medium aushärten konnte.

2.7 Immunhistochemie für NPY (nach HSU et al.1981)

Die Methodik der Immunhistochemie dient der Darstellung von Substanzen, gegen die sich Antikörper herstellen lassen. Viele Antikörper sind kommerziell erhältlich, so auch der Antikörper gegen den Neurotransmitter Neuropeptid Y (NPY). Generell wurde in dieser Arbeit der Erst-Antikörper gegen NPY mit einem biotinilierten Zweit-Antikörper detektiert, der wiederum als Angriffstelle für einen Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Komplex) dient, der Meerrettichperoxidase enthält. Die Meerrettichperoxidase oxidiert ihrerseits den Farbstoff Diaminobenzidin (DAB) in Gegenwart von H₂O₂, so dass ein Farbniederschlag am Ort der Antikörperbindung entsteht. Das Signal konnte durch Verwendung von Ammonium-Nickel-Sulfat noch verstärkt werden. Zur Bildung des ABC-Komplexes wurde der Vectastain[®] Elite[®] ABC-Kit verwendet.

Die Schnitte wurden vor der Immunfärbeprozedur auf Objektträger aufgezogen und an der Luft getrocknet. Alle Lösungen wurden in 250 ml Küvetten vorgehalten. Ausnahmen waren dabei aus Kostengründen der Blocking-Puffer, die Erst-Antikörper-Lösung, die Zweit-Antikörper-Lösung und die ABC-Komplex-Lösung. Von diesen Lösungen wurden je 100µl auf die Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer, deren Boden mit einem wassergetränkten Zellstofftuch bedeckt war. Am Ende jeder Inkubation wurden die Lösungen abgeschlagen. Für die Waschschritte in den 250 ml Küvetten wurden die Objektträger in einen Objektträgerhalter gestellt, der 24 Objektträger aufnahm.

Zu Beginn wurde dreimal für fünf Minuten in 0,1 M PBS mit Triton gespült. Anschließend wurde die endogene Peroxidase in einer Lösung aus Methanol und 1 % H₂O₂ für 20 Minuten im Dunkeln gehemmt. Nach fünfminütigem Spülen in 0,1 M PBS

mit Triton wurde der Blocking-Puffer zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf die Objektträger gegeben. Die Inkubation erfolgte für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde die Erst-Antikörper-Lösung (Anti-NPY Verdünnung: 1:500) aufgetragen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde zunächst dreimal fünf Minuten in 0,1 M PBS mit Triton gespült und dann die Zweit-Antikörper-Lösung auf die Objektträger gegeben. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei 37 °C. Nach einem weiteren Waschschrift folgte die Inkubation mit der ABC-Komplex-Lösung über eine Stunde bei 37 °C. Im nächsten Schritt wurde nochmals dreimal fünf Minuten mit 0,1 M PBS gespült. Fünfminütiges Inkubieren in DAB-Nickel-Lösung mit H₂O₂ schloss die Färbung ab. Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe (30, 50, 70, 95 und zweimal 100 % Ethanol für je zwei Minuten) und zweimaligem fünfminütigen Spülen in Xylol konnten die Objektträger mit DPX eingedeckt werden. Hierzu wurde mit einem Glasstab DPX auf den Objektträger gegeben und ein Deckgläschen vorsichtig mit Hilfe einer Präpariernadel aufgelegt.

2.8 Aktivitätsregistrierung

Die Registrierung der lokomotorischen Gesamtaktivität der im Versuch befindlichen Tiere erfolgte über Infrarot (IR)-Bewegungsmelder. Diese waren direkt über den Käfigen an einem Kabelkanal angebracht, so dass alle Bewegungen einer Wärmequelle (Versuchstier) in jedem Bereich des Käfigs registriert werden konnte. Als Reaktion des Infrarotsensors auf Wärme und Bewegung erfolgte eine ca. drei Sekunden andauernde Unterbrechung eines Stromkreises dessen Spannung auf 5 V begrenzt war. In diesem Zeitraum (Refraktärzeit des Detektors) blieben weitere Bewegungen der Versuchstiere unregistriert. Das Absinken der Spannung von 5 auf 0 V wurde von einer INPUT/OUTPUT-Karte in einem Computer als einzelnes Signal interpretiert, mittels QuickBASIC-Programm über einen definierten Zeitraum von sechs Minuten summiert (= 240 Datenpunkte/Tag) und anschließend abgespeichert. Durch die zum Teil unterschiedliche Refraktärzeit und Empfindlichkeit der IR-Sensoren, können die erfassten Werte nicht vorbehaltlos als absolute Werte verstanden werden.

2.9 Tiermodell der lichtinduzierten Arrhythmie (nach STEINLECHNER et al. 2002)

Nach einer Aktivitätsregistrierung über zwei Wochen wurden die Tiere in zwei aufeinander folgenden Nächten einem 15minütigen Lichtpuls ausgesetzt. In der ersten

Nacht geschah dies zwei Stunden vor Ende der Dunkelphase, in der zweiten zwei Stunden nach Beginn der Dunkelphase. Die Aktivitätsregistrierung wurde noch mindestens zwei Wochen weitergeführt, um sicher entscheiden zu können, welche Tiere arrhythmisch geworden sind. Danach wurden die Tiere getötet und perfundiert.

2.10 Auswertung und Statistik

Zur computergestützten Auswertung der belichteten Filme der *in situ*-Hybridisierung wurden diese mit einem Flachbrettscanner (ScanJet ADF, Hewlett Packard) eingelesen. Dieser wurde mit der dazugehörigen Software (HP Precision Scan, Hewlett Packard) betrieben. Mit Adobe Photoshop 5.0 (Adobe Systems, USA) wurden Bereiche um den SCN ausgeschnitten und mit dem Programm Scion Image (Scion corporation, Maryland, USA) ausgewertet. Die Maximum-Werte der Maximum/Minimum-Analyse wurden für jeden Durchgang in relative Werte überführt, d. h. 100% war der höchste Maximalwert 0% der niedrigste. Zur Unterstützung der computergestützten Auswertung fand eine visuelle Auswertung statt, die zudem eine Beurteilung der Symmetrie des Signals zuließ, d. h. es konnten mögliche Unterschiede zwischen dem rechten und linken SCN erfasst werden. Die visuelle, mikroskopische Auswertung der *in situ*-Hybridisierung fand an einem Dunkelfeld-Mikroskop mit zusätzlicher UV-Lampe statt. Die Bilder wurden mit einer angeschlossenen Digitalkamera gemacht. Es wurden, wie von S. YAMAMOTO et al. (2001) beschrieben, sechs Stufen für die Expression festgelegt (Abbildung 1): von 0 (keine Expression) bis 5 (überdurchschnittliche Expression).

Auch für die Auswertung des immunhistologischen Nachweis von NPY wurde die Ausdehnung der Expression in Stufen eingeteilt: Neben Schnitten, die kein Signal im SCN zeigten (Abbildung 2a), gab es Schnitte, die vom ventralen Bereich des SCN ausgehend immunreaktive Bereiche enthielten (Abbildung 2b und 2c). Die Größe des immunreaktiven Bereichs variierte dabei auch in den verschiedenen Schnitten eines Tieres. Da NPY nicht im Zellsoma des SCN vorliegt, sondern in den diese Zellen umgebenden Axonen der IGL-Neurone, konnten keine Zellen gezählt werden, um das Signal exakter zu quantifizieren (Abbildung 2d). Daher wurden zur Bewertung drei Stufen des Signals unterschieden (Abbildung 2a-c). Diese Stufen bezogen sich nicht auf die Intensität des Signals, da dies durch die vielen Verstärkungsschritte der ABC-Methode nicht zulässig war, sondern auf das Ausmaß des immunreaktiven Bereichs im SCN. Dabei bedeutete die Stufe 0, dass kein Signal vorhanden war (Abbildung 2a). Zur Stufe 1

wurden alle Präparate gezählt, bei denen ein ventraler Streifen des SCN immunreaktiv war (Abbildung 2b). Stufe 2 stand für einen komplett angefärbten SCN (Abbildung 2c), wobei auch in diesem Fall der ventrale Bereich ein intensiveres Signal zeigte. Zur weiteren Differenzierung wurde der SCN für den rostral, den medial und den caudal gelegenen Bereich getrennt bewertet.

Die Auswertung der Aktivitätsmessung erfolgte mit QuickBasic-Programmen der Arbeitsgruppe. Die Doppelplot-Aktogramme wurden visuell ausgewertet und zusätzlich stand ein Computerprogramm zur Verfügung, das mittels Chi-Quadrat-Periodogramm (nach SOKOLOVE und BUSHELL 1978)) die Tagesrhythmik analysierte. Mit einem weiteren QuickBasic-Programm wurde die Aktivität je Stunde und je Tag erfasst. Da die Werte nicht als absolute Werte zu vergleichen sind (siehe 2.8), wurden sie je Stunde als prozentualer Wert der Gesamtaktivität des Tages erfasst. Für die Zeit vor den Lichtpulsen wurde dabei der Mittelwert der letzten zehn Tage gebildet. Zum Vergleich der Tiergruppen wurde ein Mittelwert dieser Mittelwerte gebildet und der Standardfehler berechnet. Bei den Werten nach den Lichtpulsen wurde gleiches Vorgehen auf die fünf Tage vor der Tötung angewendet.

Statistische Auswertungen wurden mit dem Programm StatView für Windows von SAS Institute Inc. (Cary, USA) durchgeführt, wobei $p < 0,05$ für alle Tests als signifikant betrachtet wurde. Es fanden der exakte Test nach Fischer und die einfaktorische Varianzanalyse (analysis of variance, ANOVA) mit anschließendem post hoc Test nach Scheffe Verwendung.

Die Dokumentation von Agarose-Gelen erfolgte mit dem Dokumentations-System Digit Store (Gesamtsystem 95 KFE 103, Intas).

Die Auswertung von DNA-Sequenzen wurde mit dem Programm MacVector 6.5.3 (Oxford Molecular Ltd., Oxford, GB) und Sequencher 2.0.6 (Gene Codes Corporation, USA) vorgenommen. Kodierende Teilsequenzen wurden mit BLAST-Datenbanken (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) identifiziert (Adresse: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

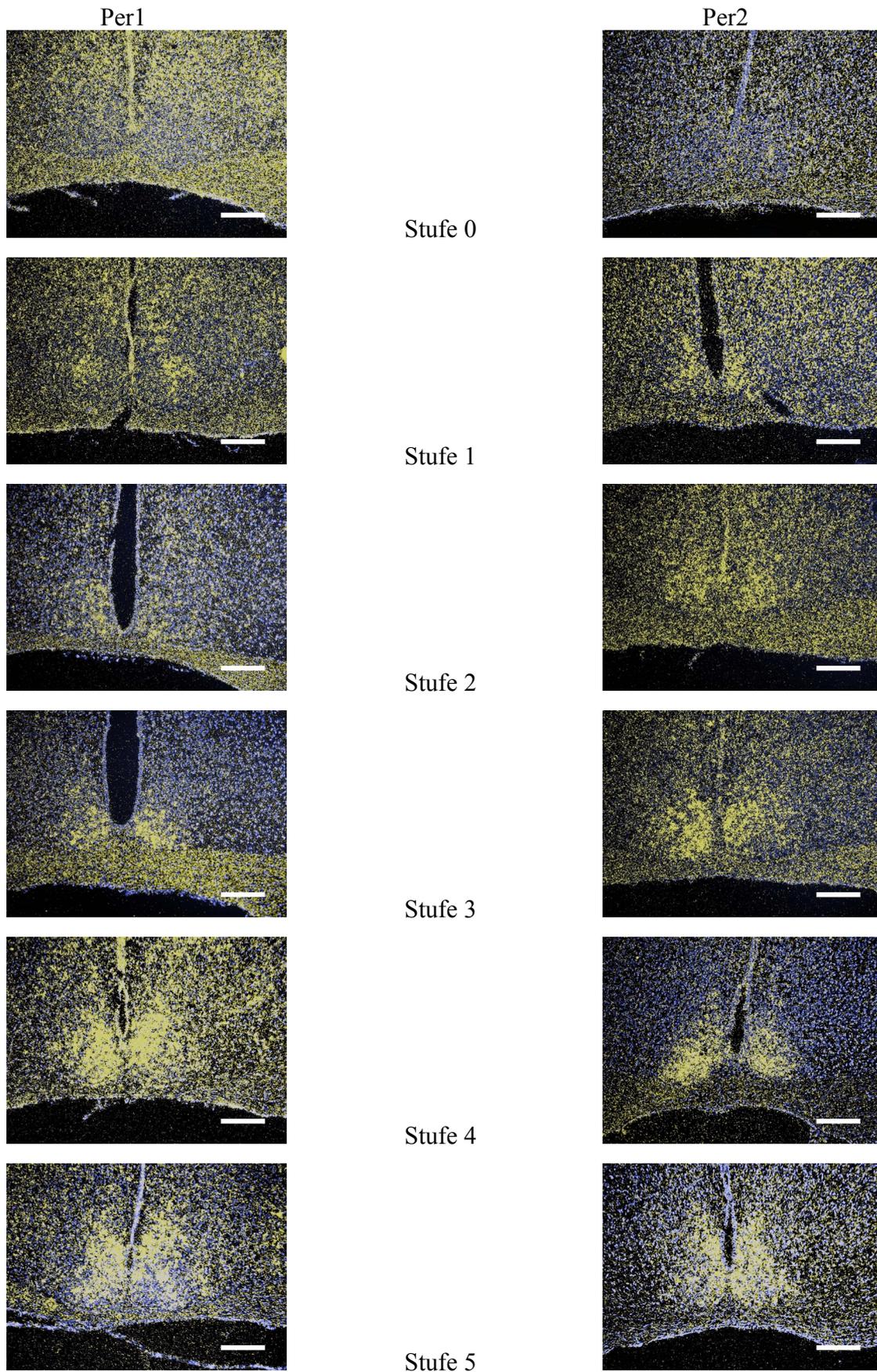


Abbildung 1:
Einteilung der Signalstärke der *Per1*- und *Per2*-Expression in sechs Stufen
(Balken = 200 μ m)

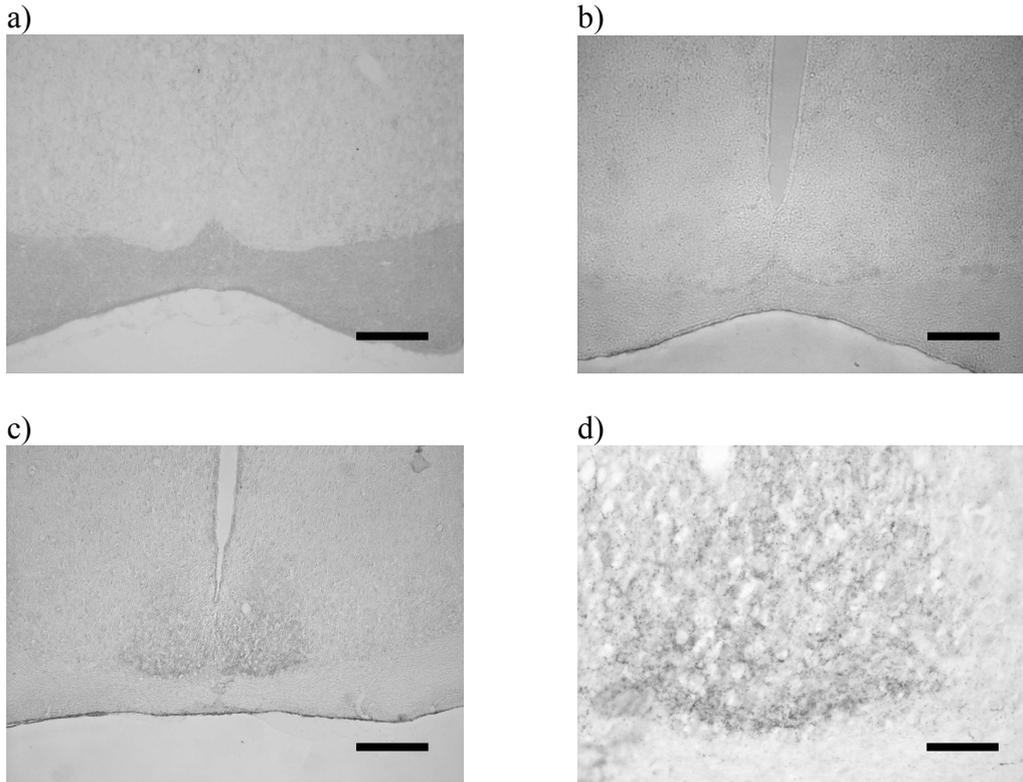


Abbildung 2:
Einteilung des immunhistochemischen Signals gegen NPY in Stufe 0 (a), Stufe 1 (b) und Stufe 2 (c) (Balken = 200 μ m).
d) Vergrößerung des rechten SCN der Aufnahme für Stufe 2. Es sind keine Zellsomata, sondern Axone gefärbt (Balken = 50 μ m).

3 Ergebnisse

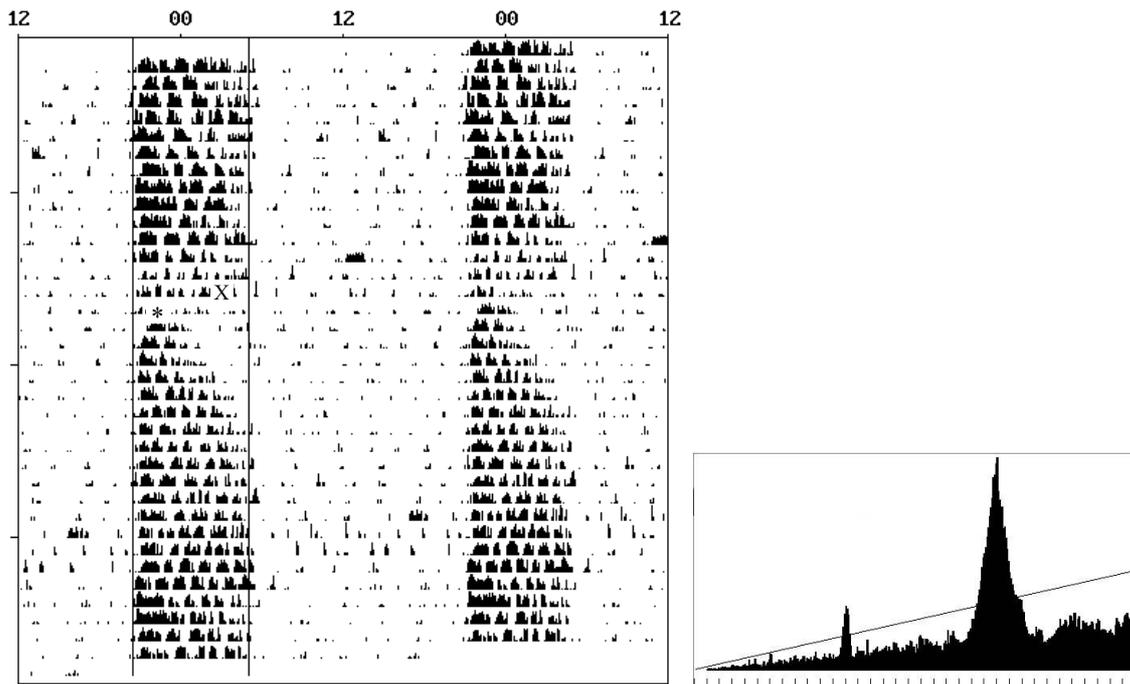
Diese Arbeit hat zum Ziel, Hintergründe für die von STEINLECHNER et al. (2002) beschriebene induzierte Arrhythmie Dsugarischer Zwerghamster aufzudecken. Hierzu wurden mehrere Zuchtlinien des Dsugarischen Zwerghamsters verwendet, um eventuelle Auswirkungen eines unterschiedlichen genetischen Hintergrunds zu analysieren. Es wurde des Weiteren erfasst, ob die Schwankungen der Genexpression, welche als Grundlage der circadianen Rhythmik gelten, beeinflusst werden und ob es Veränderungen in der Innervation durch den IGL (*intergeniculate leaflet*) gibt.

3.1 Untersuchung des Tiermodells

3.1.1 Ausbeute an lichtinduziert arrhythmischen Tieren

Das Tiermodell der lichtinduzierten Arrhythmie wurde in dieser Arbeit nach der oben beschriebenen Methode (STEINLECHNER et al. 2002) erstellt. Die lokomotorische Aktivität der Tiere wurde aufgezeichnet (siehe Material und Methoden), um ihre Tagesrhythmik zu erfassen. Die Auswertung erfolgte über Doppelplot-Aktogramme (Abbildung 3) und die Chi-Quadrat-Periodogrammanalyse (SOKOLOVE und BUSHELL, 1978) (Abbildung 4). Von 625 eingesetzten Tieren wurden 73 (11,7%) arrhythmisch.

a)



b)

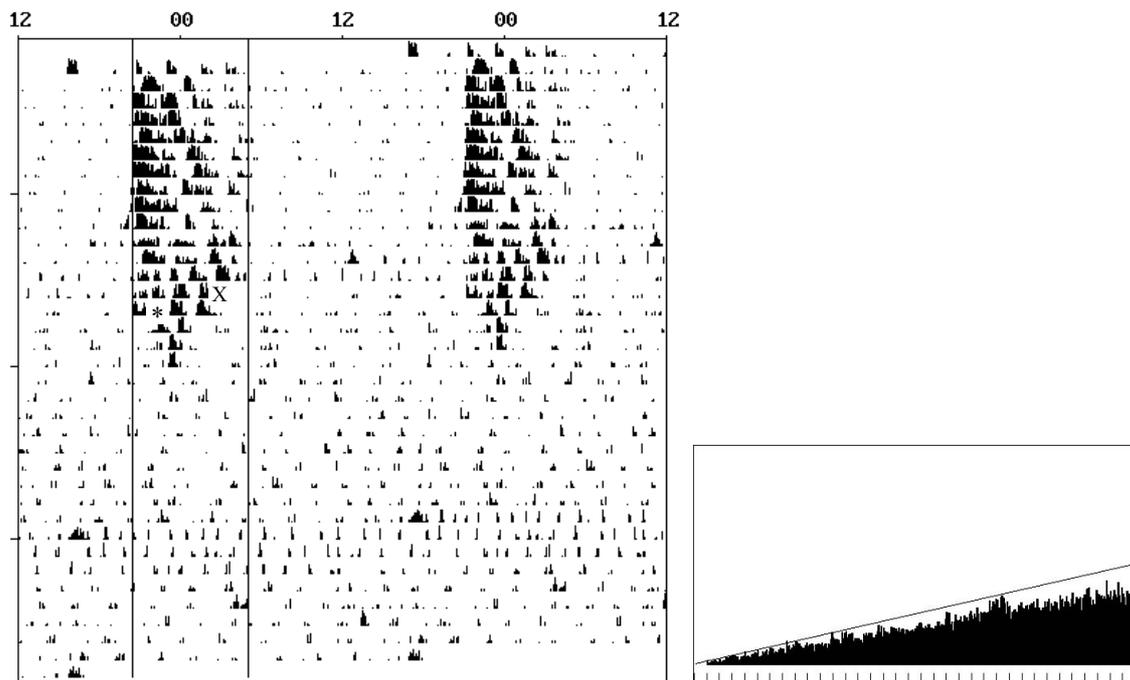
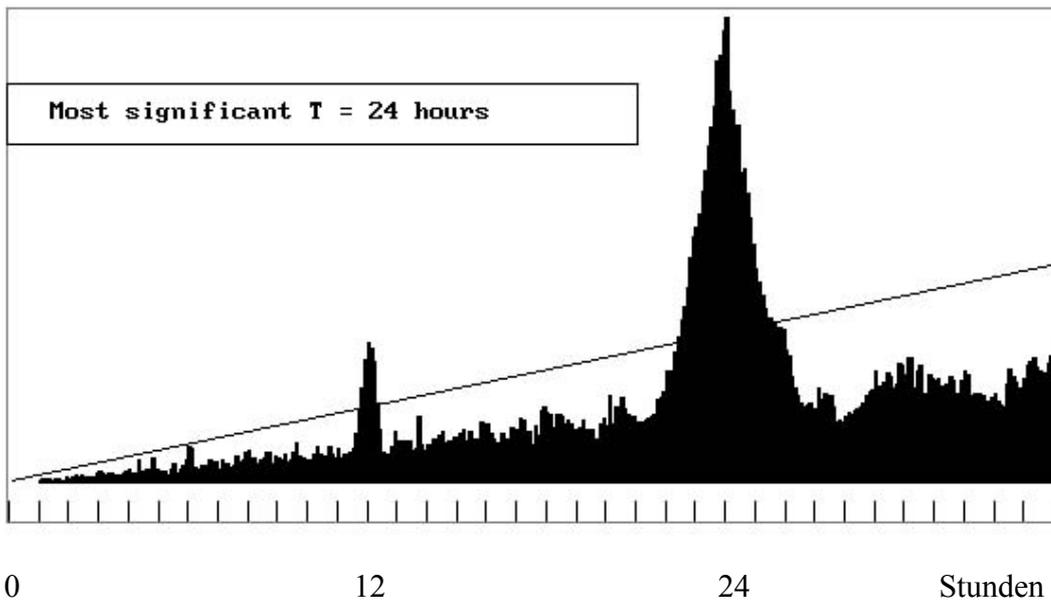


Abbildung 3:

Aktogramme eines rhythmischen (a) und eines arrhythmischen (b) Dsungarischen Zwerghamsters. Die Lichtpulse wurden am Ende der 14. Nacht (X) und am Anfang der 15. Nacht (*) gegeben. Die neben den Aktogrammen stehenden Chi-Quadrat-Periodogramme analysieren die letzten zehn Tage und sind in Abbildung 4 genauer beschrieben.

a)



b)

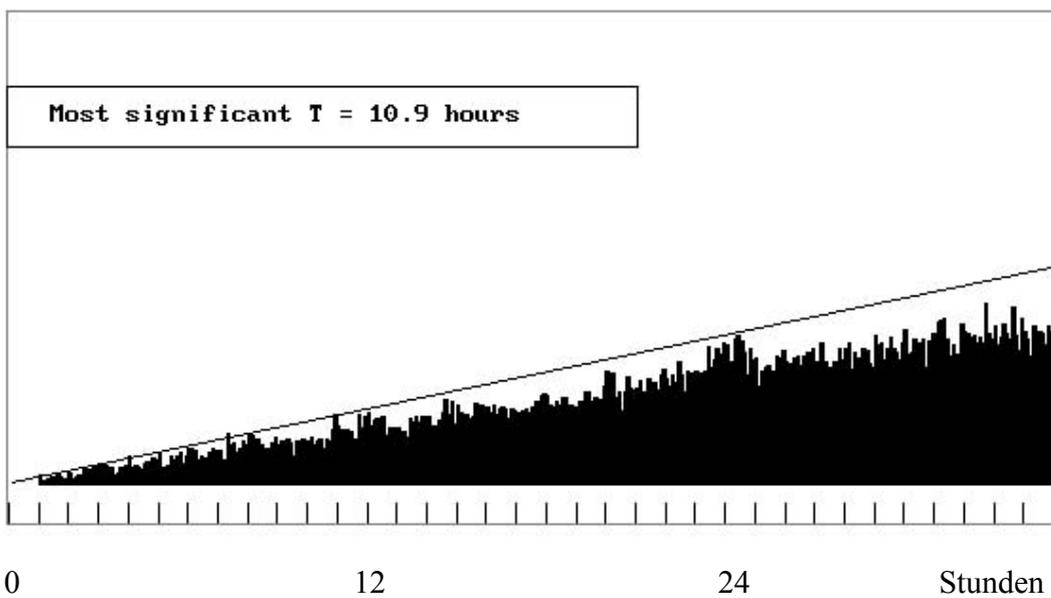


Abbildung 4:

Chi-Quadrat-Periodogramme über 10 Tage: a) eines rhythmischen Tieres; b) eines arrhythmischen Tieres. (Jeder Teilstrich der X-Achse entspricht einer Stunde, und die Diagonale entspricht der Signifikanzgrenze.)

3.1.2 Unterschiede zwischen rhythmischen und arrhythmischen Tieren

Zur Erfassung von Unterschieden in der Aktivität jener Tiere, die ihre Rhythmik beibehalten und jenen, die arrhythmisch werden, wurde sowohl die tägliche Gesamtaktivität als auch die Aktivität vor und nach den Lichtpulsen untersucht. Dabei war die Gesamtaktivität vor und nach den Lichtpulsen genauso von Interesse wie die Aktivität, die im Vorfeld zu den Zeitpunkten der späteren Lichtpulse zu finden war.

Es wurde ein Durchschnittswert für die tägliche Gesamtaktivität der letzten zehn Tage vor dem Lichtpuls ermittelt (Abbildung 5). Für diesen Zeitraum wurde auch der prozentuale Anteil der Tagesaktivität eine Stunde vor und nach den Zeitpunkten der späteren Lichtpulse ausgewertet (Abbildung 6).

Für die letzten fünf Tage vor einer Perfusion wurde die durchschnittliche Gesamtaktivität je Tag erfasst, um diesen Wert mit der Gesamtaktivität vor den Lichtpulsen vergleichen zu können (Abbildung 7).

Der Vergleich der durchschnittlichen Gesamtaktivität vor den Lichtpulsen ergab, dass sich die rhythmisch bleibenden Tiere mit 938 ± 71 Impulsen pro Tag nicht signifikant von den später arrhythmisch werdenden Tieren mit 859 ± 99 Impulsen pro Tag unterschieden (Abbildung 5).

Der prozentuale Anteil an der Gesamtaktivität für diese zehn Tage war für die Stunde vor ZT 18 im Schnitt $16 \pm 0,6$ %. Für die folgende Stunde waren es $12,4 \pm 0,5$ %. Die Werte eine Stunde vor und nach dem Zeitpunkt ZT 22 waren mit $8,6 \pm 1,3$ % und $7,7 \pm 0,3$ % signifikant geringer als die zuvor genannten. Die Werte der arrhythmischen Tiere wiesen mit $15,5 \pm 1,7$ % und $13,8 \pm 1,7$ % für die Stunde vor und nach ZT 18 sowie $10,1 \pm 1,7$ % und $9,2 \pm 0,4$ % für die Stunde vor und nach ZT 22 keinen signifikanten Unterschied zu den Werten der rhythmischen Tiere auf (Abbildung 6).

Für die Gesamtaktivität nach den Lichtpulsen (Abbildung 7) zeigte sich, dass die rhythmischen Tiere mit einer im Durchschnitt um $9,5 \pm 6,0$ % erhöhten Aktivität keine signifikante Veränderung aufweisen. Die Abnahme der Gesamtaktivität um $28,8 \pm 8,2$ % bei den arrhythmischen Tieren ist hingegen eine signifikante Veränderung.

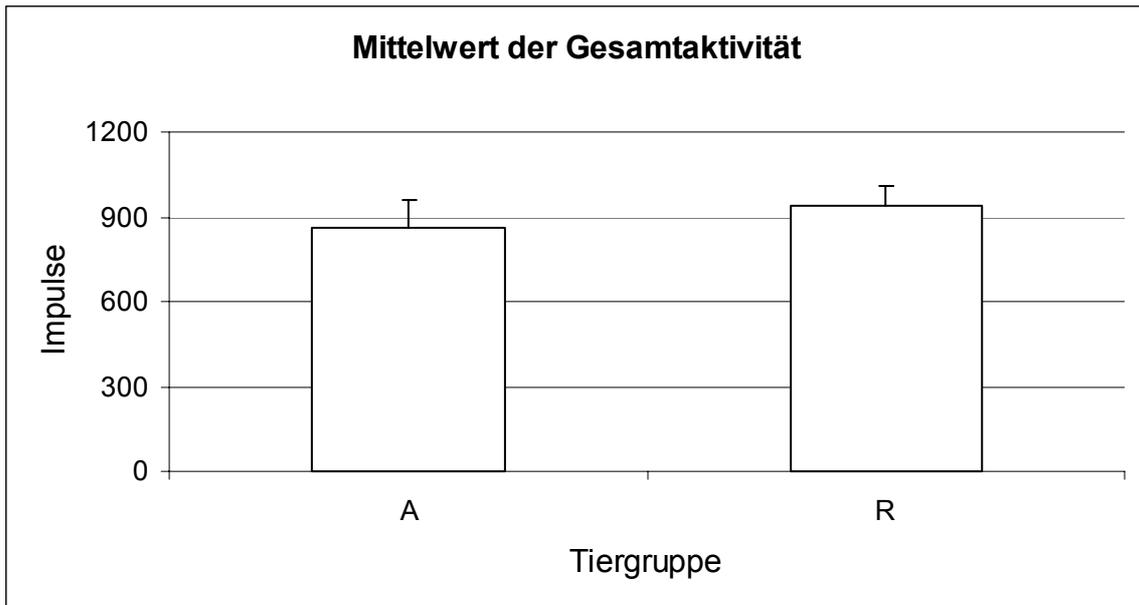


Abbildung 5:
Die Mittelwerte mit Standardfehler der täglichen Gesamtaktivität von den zehn Tagen vor den Lichtpulsen für arrhythmische (A, n=29) und rhythmische (R, n=51) Tiere.

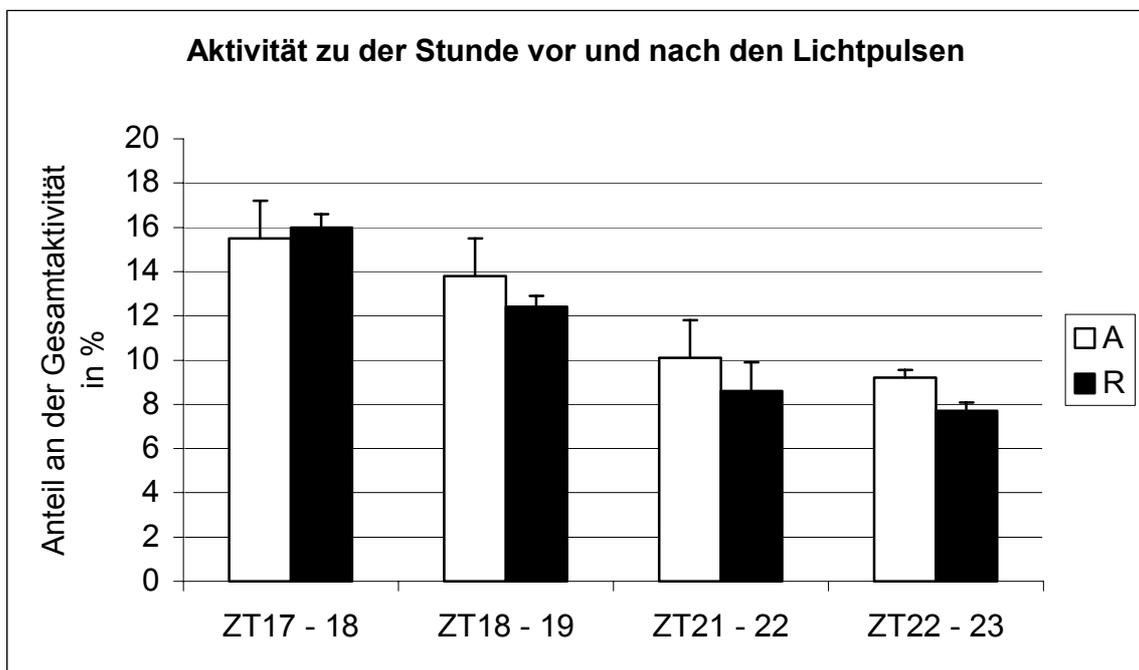


Abbildung 6:
Prozentualer Anteil an der durchschnittlichen Gesamtaktivität der zehn Tage vor den Lichtpulsen. Die Stunde vor und nach den Zeitpunkten der späteren Lichtpulse ist für arrhythmische (A) und rhythmische (R) Tiere getrennt dargestellt.

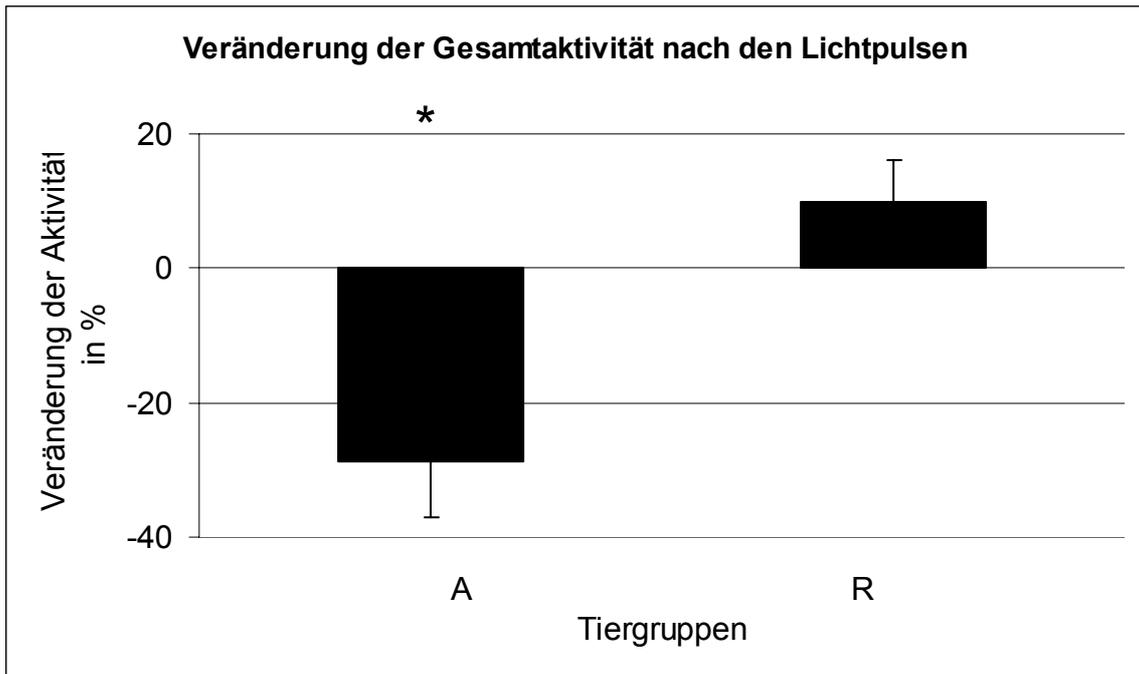


Abbildung 7:
Prozentuale Veränderung der täglichen Gesamtaktivität für arrhythmische (A) und rhythmische (R) Tiere. Die Veränderung bei den arrhythmischen Tieren ist signifikant (* = $p < 0,05$).

3.1.3 Unterscheidung der Zuchtlinien

Für andere mit der circadianen Rhythmik in Verbindung stehende Unterschiede zwischen Tiergruppen wie dem beschleunigten Freilauf bei der Tau-Mutante oder dem Fehlen der Winteradaptation bei den „Kurz-Tag-Nonrespondern“ (siehe 1.2) konnte ein genetischer Hintergrund belegt werden. Dies gibt den Anlass, drei am Institut gehaltene Zuchtlinien für die Erstellung des Modells getrennt zu betrachten.

3.1.3.1 Morphologische und zuchtbedingte Unterscheidung der Zuchtlinien

Die Einteilung der Zuchtlinien ZL 1, ZL 2 und ZL 3 beruht auf der Herkunft der Tiere, mit denen die Zucht begonnen wurde (siehe 2.1). ZL 4 ist der Anfang einer Inzuchtlinie mit Elterntieren aus ZL 3. Die morphologische Betrachtung der Tiere und die Erfassung ihres Zuchterfolges soll Aufschluss über genetische Unterschiede zwischen den Gruppen geben.

Die Zuchtlinien ZL 1 und ZL 3 züchteten ohne Probleme. Weniger als 10% der Cousin-Verpaarungen blieben ohne Zuchterfolg. Bei ZL 2, einer Zuchtlinie, die auf nur zwei züchtenden Pärchen aufgebaut wurde, lag der Zuchterfolg lediglich bei 50%. Bei der Geschwisterverpaarung für ZL 4 konnten in der ersten Generation noch Zuchterfolge wie für ZL 3 beschrieben verbucht werden, doch in der zweiten und dritten Generation züchteten nur noch 50% der Verpaarungen. Vier Verpaarungen zwischen Tieren, die induziert arrhythmisch waren, blieben ohne Zuchterfolg.

Die Zuchtlinien ließen sich morphologisch unterscheiden, was bei gleichen Haltungsbedingungen einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund wahrscheinlich erscheinen lässt. Die Tiere aus ZL 1 sind dunkler gefärbt (Abbildung 8a) als die übrigen und werden im Kurztag nicht komplett weiß. Die Tiere aus ZL 2 hingegen haben ein fahles Fell (Abbildung 8c), einen etwas hochbeinigen Gang und färbt im Winter besonders gut um. ZL3 liegt bei allen Merkmalen zwischen ZL1 und ZL2 (Abbildung 8b). ZL 4 entsprach im beobachteten Zeitraum ZL 3.

a)



b)



c)



Abbildung 8:
Die drei im Institut für Zoologie gehaltenen Zuchtlinien des Dsungarischen Zwerghamsters (*Phodopus sungorus*) (ZL1 (a), ZL2 (b), ZL3 (c)) lassen sich morphologisch unterscheiden.

3.1.3.2 Unterscheidung der Zuchtlinien im Tiermodell

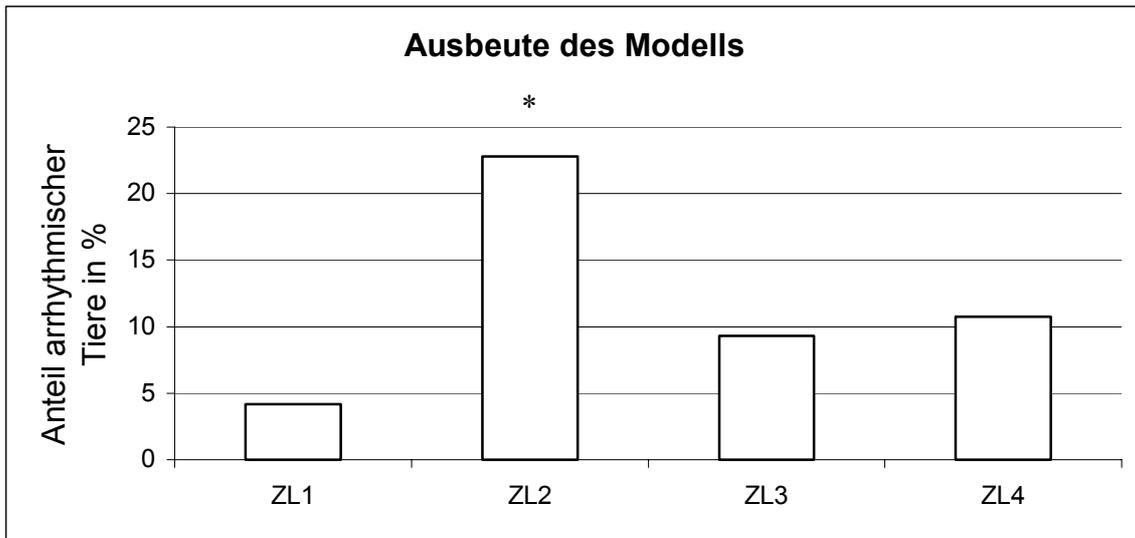
Die Betrachtung genetisch verschiedener Zuchtlinien wurde genutzt, um einen möglichen genetischen Hintergrund für das Tiermodell zu untersuchen. Hierzu wurde die Ausbeute an arrhythmischen Tieren je Zuchtlinie erfasst (Abbildung 9a). Eine Aufspaltung der Gruppen in Jahrgänge sollte weitere Hinweise auf einen genetischen Hintergrund liefern, denn nur wenn ein Merkmal über mehrere Generationen auftritt, ist ein genetischer Hintergrund wahrscheinlich (Abbildung 9b).

Die Anzahl an eingesetzten Tieren je Zuchtlinie ist recht unterschiedlich. Wegen der extrem geringen Ausbeute (siehe unten) wurden von ZL1 nur 48 Tiere eingesetzt. Von ZL2 standen 114 Tiere zur Verfügung. ZL3 und ZL4 stellten mit 268 und 195 Tieren den größten Teil untersuchter Tiere.

Die Ausbeute an arrhythmischen Tieren für die vier Zuchtlinien war recht unterschiedlich (Abbildung 9a). Während von den 48 Tieren aus ZL1 nur ein Tier (2 %) arrhythmisch wurde, waren es bei ZL2 22 % (26 von 114 Tieren). ZL3 und ZL4 lagen mit 9 % (25 von 268 Tieren), bzw. 10 % (21 von 195 Tieren) zwischen diesen Extremen. Nach dem exakten Test von Fischer, wie er von StatView verwendet wird, war die Ausbeute an arrhythmischen Tieren bei ZL2 signifikant höher als in den anderen Zuchtlinien. Dass die Ausbeute von ZL1 nicht signifikant geringer ist als die von ZL3 und ZL4, liegt an der geringen Tierzahl von ZL1; eine Tendenz ist aber klar zu erkennen.

Eine zeitliche Aufspaltung in Jahrgänge bei der Erstellung der lichtinduzierten Arrhythmie (Abbildung 9b) zeigt bei ZL3 mit einer Anzahl von fünf bis 12 arrhythmischen Tieren bei 86 bis 92 eingesetzten Tieren eine nicht unerhebliche Schwankung in der Ausbeute. Die Werte unterschieden sich aber nicht signifikant. ZL2 zeigte über die Jahrgänge betrachtet einen Rückgang der Ausbeute an arrhythmischen Tieren. Diese Veränderung ist jedoch nach dem exakten Test von Fischer nicht signifikant.

a)



b)

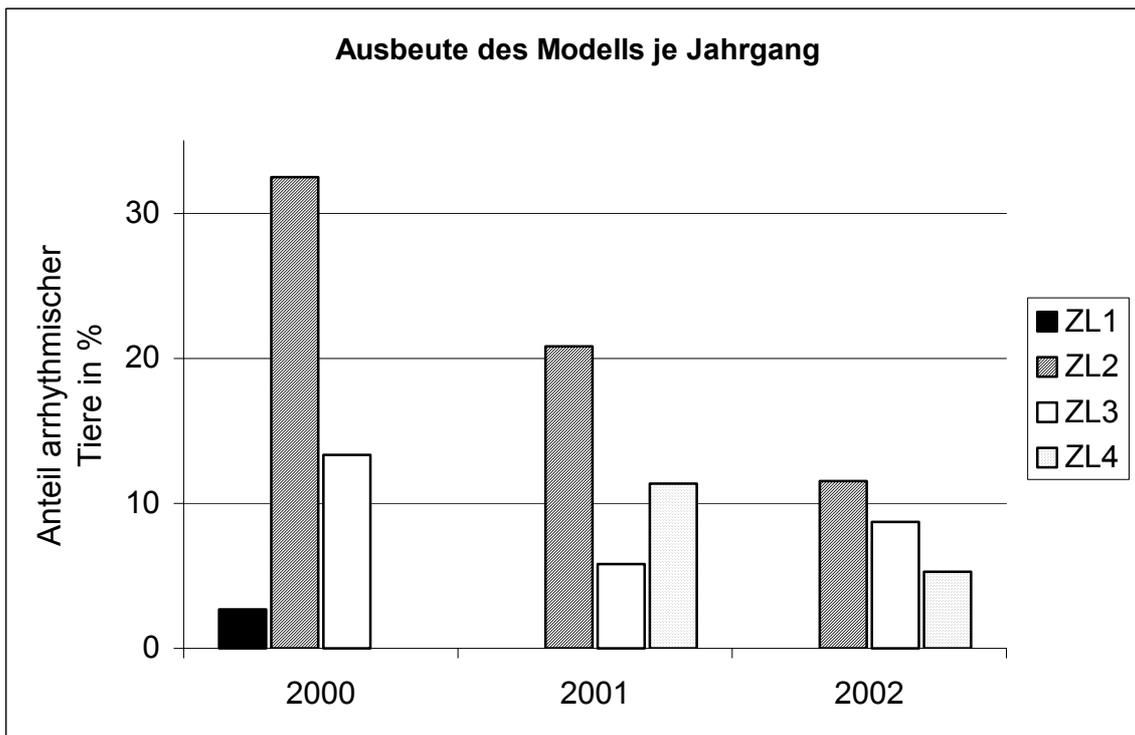


Abbildung 9:

Die Ausbeute des Modells der lichtinduzierten Arrhythmie als prozentualer Anteil der arrhythmischen Tiere von den eingesetzten Tieren. Die Zuchtlinien ZL1, ZL2, ZL3a und ZL3b werden sowohl für die gesamte Zeit (a) als auch für jeden Jahrgang (b) ausgewertet. (* = $p < 0,05$)

3.1.4 Differenzierte Bewertung der Aktogramme

Zur genaueren Charakterisierung des Modells wurde die Reaktion auf die Lichtpulse in den Doppelplot-Aktogrammen betrachtet. Die Reaktion wurde dann auf Zusammenhänge zwischen der Arrhythmie und den Zuchtlinien untersucht.

Es ließen sich grundsätzlich sechs Reaktionen auf die Lichtpulse unterscheiden (Abbildung 10a-f):

- Aktogrammtyp 0: Beibehalten eines 24-Stunden-Rhythmus ohne α -Kompression (7 % der Tiere)
- Aktogrammtyp 1: einseitige α -Kompression bei unverändertem Aktivitätsbeginn (39 % der Tiere)
- Aktogrammtyp 2: beidseitige α -Kompression (29 % der Tiere)
- Aktogrammtyp 3: einseitige α -Kompression bei in die Hell-Phase verschobenem Aktivitätsbeginn (15 % der Tiere)
- Aktogrammtyp 4: fortschreitende beidseitige α -Kompression (7 % der Tiere)
- Aktogrammtyp 5: sofortiger Verlust eines erkennbaren 24-Stunden-Rhythmus (3 % der Tiere)

Bei allen Aktogrammtypen konnten die Tiere rhythmisch bleiben oder wieder werden (Abbildung 10). Zeigten die Tiere Reaktionen von Typ 3, Typ 4 und Typ 5 konnten sie arrhythmisch werden (Abbildung 11 und 12). 17 % der Tiere (16 von 94) des Aktogrammtyps 3 wurden arrhythmisch. Bei den Tieren des Aktogrammtyps 4 (40, davon 95 % bzw. 38 Tiere arrhythmisch) und des Aktogrammtyps 5 (19, davon 84 % bzw. 16 Tiere arrhythmisch) zeigten die Aktogramme aller Tiere erst eine arrhythmische Phase, jedoch wurden 2 bzw. 4 Tiere wieder rhythmisch. Bei Tieren des Aktogrammtyps 3 trat dieses Phänomen, bei dem die Tiere erst für einige Tage arrhythmisch wirkten und dann doch wieder rhythmisch wurden, bei fünf Tieren auf.

Zwischen den Zuchtlinien gab es Unterschiede in der Verteilung auf die sechs Aktogrammtypen (Abbildung 13). Aktogrammtyp 0 tritt bei ZL 1 deutlich häufiger auf als bei den anderen Zuchtlinien. Bei allen Zuchtlinien entsprach ein Drittel der Aktogramme dem Aktogrammtyp 1. Aktogrammtyp 2 tritt etwas häufiger bei ZL 4 auf. ZL2 mit dem signifikant erhöhten Anteil an arrhythmischen Tieren (siehe oben) hat jeweils den größten prozentualen Anteil an Tieren mit Aktogrammen von Typ 3, Typ 4 und Typ 5. Die Aktogrammtypen 4 und 5 treten bei Tieren der Zuchtlinie ZL1 nicht auf.

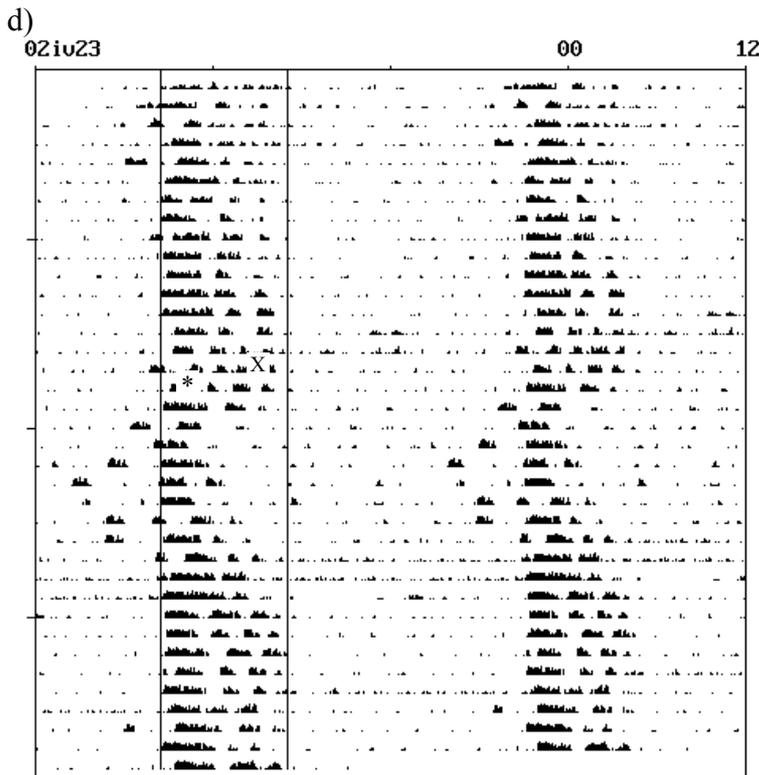
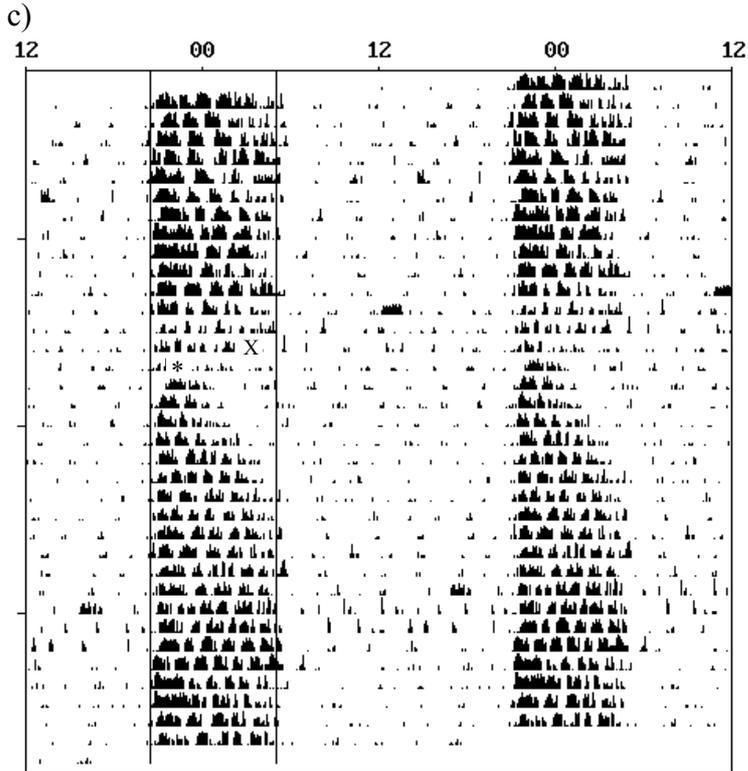


Abbildung 10:
 Aktogramme, die die verschiedenen Typen der Reaktion auf die Lichtpulse (X = ZT18, * = ZT22) zeigen. Typ 0 (a) zeigt keine Reaktion, während bei Typ 1 (b) eine einseitige α -Kompression zu sehen ist. Typ 2 (c) zeigt eine beidseitige α -Kompression. Typ 3 (d) ähnelt Typ 1, hat jedoch zusätzlich einen in die Hellphase verschobenen Aktivitätsbeginn. Typ 4 (e) ist durch fortschreitende beidseitige α -Kompression gekennzeichnet. Einen sofortigen, eventuell nur vorübergehenden Verlust des erkennbaren 24-Stunden-Rhythmus zeichnet Typ 4 (f) aus.

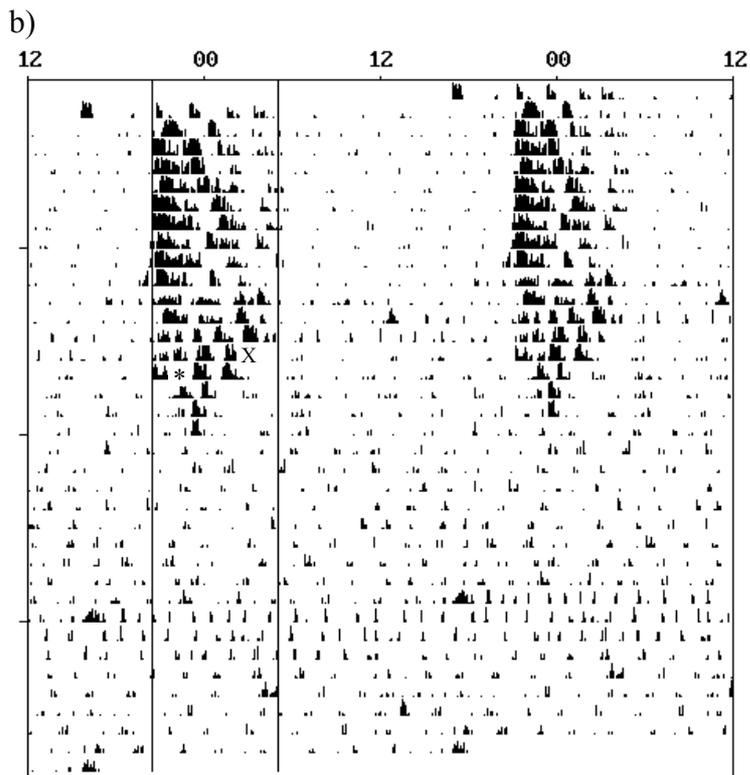
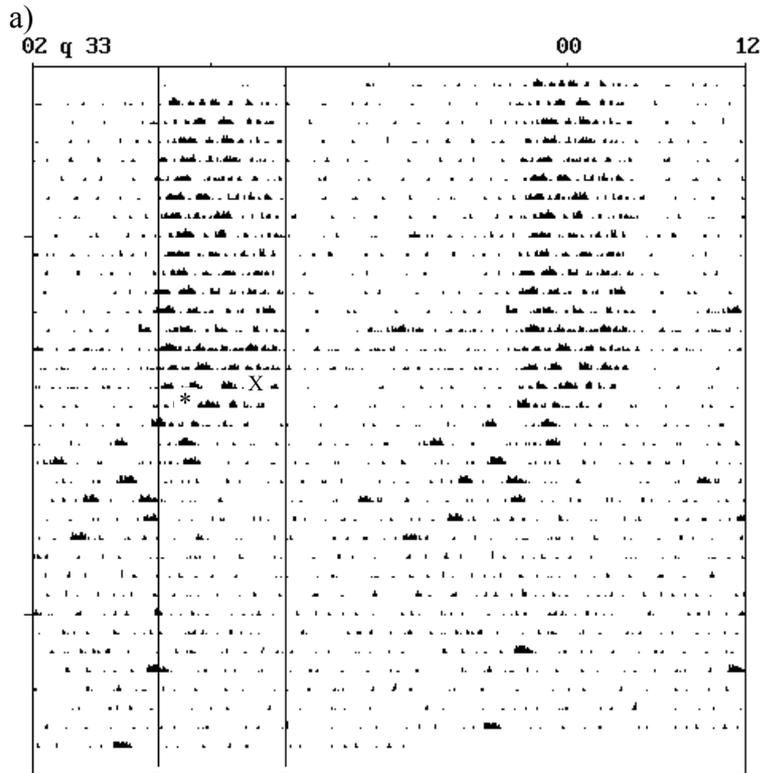


Abbildung 11:

Aktogramme arrhythmischer Tiere, der Aktogrammtypen 3 bis 5.

a) Typ 3

b) Typ 4

c) Typ 5

Für die Typen 0 bis 2 gibt es keine arrhythmischen Tiere. (Lichtpulse: X = ZT18, * = ZT22)

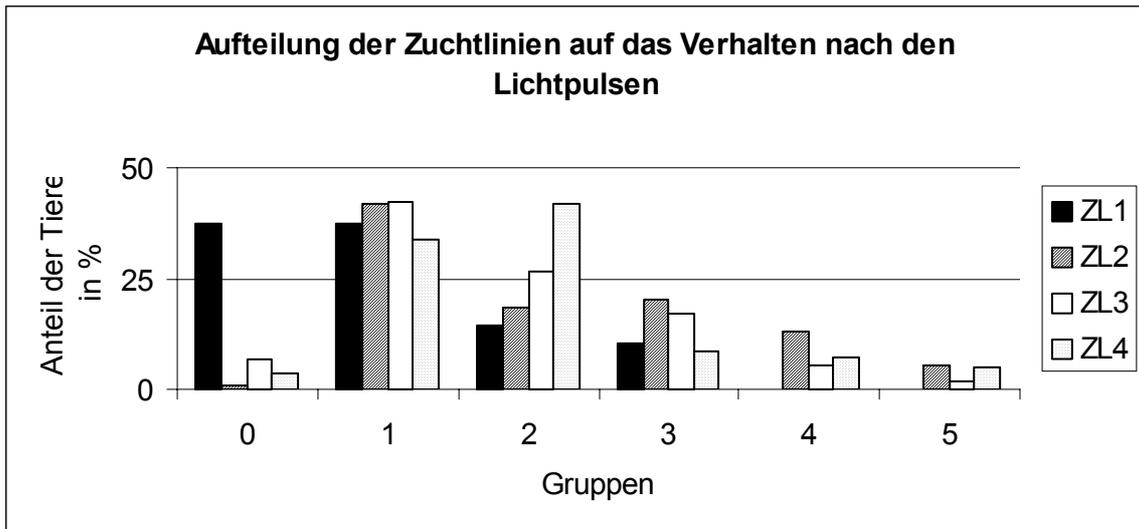


Abbildung 13:

Anteil der Tiere aus den vier Zuchtlinien (ZL1 bis ZL4) verteilt auf die sechs Typen von Reaktionen auf die Lichtpulse (0 bis 5).

3.2 RT-PCR

Ziel der RT-PCR war es, eine cDNA herzustellen, die einem Teilstück der *Per2*-RNA aus *Phodopus sungorus* entspricht. Diese cDNA sollte dann als Vorlage für die RNA-Sonden der *in situ*-Hybridisierung dienen.

Es konnte eine 290 Basenpaare umfassende Sequenz ermittelt werden. Ein Vergleich dieser Sequenz (GenBank) mit der BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)-Datenbank (Adresse: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) ergab, dass die Sequenz identisch mit dem entsprechenden Teil der für *Mesocricetus auratus* bekannten *Per2*-cDNA (GenBank) ist:

```

P. sungorus: 1 tcagggcagtgactgtgatgacaatgggaaggagctgcg 39
                |||
M. auratus: 146 tcagggcagtgactgtgatgacaatgggaaggagctgcg 185

P. sungorus: 40 gatgctcgtggaaccttccagcgctcaccgagccctga 78
                |||
M. auratus: 186 gatgctcgtggaaccttccagcgctcaccgagccctga 225

P. sungorus: 79 tgccttcagactgatgatgacagagccagaacacaacc 117
                |||
M. auratus: 226 tgccttcagactgatgatgacagagccagaacacaacc 264

P. sungorus:118 ctccacaagcggctgcagtagtgagcagtctgccaaagc 156
                |||
M. auratus: 265 ctccacaagcggctgcagtagtgagcagtctgccaaagc 303

P. sungorus:157 tgacgcgcacaaagaactgataaggaccctgagagagct 195
                |||
M. auratus: 304 tgacgcgcacaaagaactgataaggaccctgagagagct 343

P. sungorus:196 gaaggttcacctcctgcagacaagaaagccaaggggaa 234
                |||
M. auratus: 344 gaaggttcacctcctgcagacaagaaagccaaggggaa 383

P. sungorus:235 ggccagcacgctggcaaccttgaagtatgccctgcgcag 273
                |||
M. auratus: 384 ggccagcacgctggcaaccttgaagtatgccctgcgcag 422

P. sungorus:274 cgtgaagcaggtgaagg 290
                |||
M. auratus: 423 cgtgaagcaggtgaagg 435

```

Das Ergebnis der RT-PCR war somit, dass es zumindest einen Bereich von 290 Basenpaaren gibt, in dem die cDNA für *Per2* von *Phodopus sungorus* mit der von *Mesocricetus auratus* identisch ist. Aus diesem Grund wurden die für uns verfügbaren von U. Albrecht und A. Loudon für *Mesocricetus auratus* etablierten Sonden bei den in dieser Arbeit durchgeführten *in situ*-Hybridisierungen genutzt.

3.3 Untersuchungen mittels *in situ*-Hybridisierung

Mittels *in situ*-Hybridisierung sollte die Genexpression zweier Uhren-Gene, *Per1* und *Per2*, zu vier verschiedenen Zeitpunkten (Mitte Tag (ZT8), Mitte Nacht (ZT20) und zu den Zeiten des Dunkel/Hell- (ZT0), bzw. Hell/Dunkel-Wechsels (ZT16)) dargestellt werden.

Die verwendeten Sonden basierten, wie schon erwähnt, auf cDNA-Teilstücken von *Per1* und *Per2* des Goldhamsters *Mesocricetus auratus*. Die Sonden wurden von U. Albrecht (*Per1*) und A. Loudon (*Per2*) zur Verfügung gestellt.

Das Signal der *in situ*-Hybridisierung wurde in zwei Formen erfasst. Zum Einen auf Autoradiographie-Filmen und zum Anderen als reduzierte Silberkörner einer Fotoemulsion direkt auf dem Objektträger. Somit konnten zwei Auswertungsmethoden eingesetzt werden:

- eine computergestützte Auswertung auf Basis der Autoradiographie-Filme mit relativen Werten zwischen 0 und 100 %, die sich auf die maximal auftretende Schwärzung des Films bezog (siehe Material und Methoden);
- eine visuelle Auswertung der Schnitte auf dem Objektträger mit dem Mikroskop im Dunkelfeld (siehe Material und Methoden). Die Stärke des Signals ließ sich in sechs Stufen (siehe Material und Methoden Abbildung 1) von null (kein Signal) bis fünf (maximales Signal im SCN) einteilen (YAMAMOTO et al. 2001).

Das Signal wurde in beiden Fällen durch die Radioaktivität der Sonde erzeugt. Die Auswertung der Autoradiographie-Filme hat den Vorteil der Objektivität, während die visuelle Auswertung eine bessere Orientierung im Gewebe zulässt. Die visuelle Auswertung ermöglichte somit eine Bewertung der Symmetrie des Signals und diente der Bestätigung der Ergebnisse der Computer-Auswertung.

3.3.1 *Per1*-Expression bei rhythmischen Tieren

Die zu vier Zeitpunkten (ZT 0 n=9, ZT 8 n=18, ZT 16 n=9 und ZT 20 n=14) erfasste *Per1*-Expression bei rhythmischen Tieren sollte zeigen, ob Unterschiede im

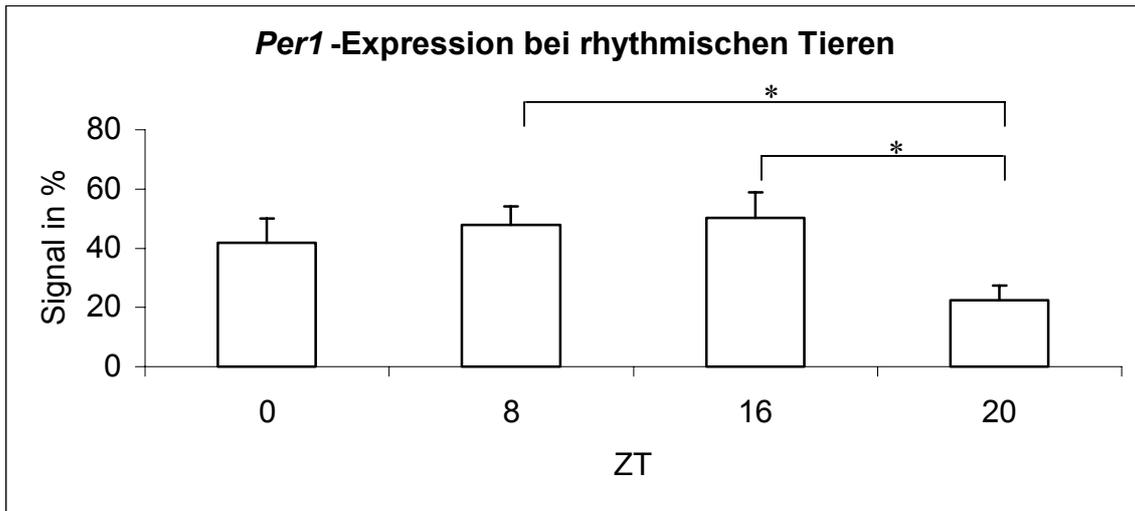
zeitlichen Verlauf zu erkennen sind (Abbildung 14). In der visuellen Auswertung wurde zudem darauf geachtet, ob es Unterschiede in der Expression im rechten und linken SCN gab.

Mittels der computergestützten Auswertung zeigte sich (Abbildung 14a), dass sich das Signal bei ZT 20 mit im Mittel $22,4 \pm 5,0\%$ von den Werten zu ZT 8 ($47,9 \pm 6,3\%$) und ZT 16 ($50 \pm 8,4\%$) signifikant unterschied. Der Wert zu ZT 0 war mit $41,8 \pm 8,1\%$ zwar tendenziell höher als zu ZT20, dies ließ sich aufgrund der hohen Streuung statistisch aber nicht absichern.

Die subjektive, optische Auswertung ergab ein ähnliches Bild mit minimalen Wert zu ZT 20 (Abbildung 14b und 15). Der Wert zu ZT 20 ($0,6 \pm 0,05$) war abweichend von den Werten der computergestützten Auswertung sogar signifikant geringer als die Werte zu allen anderen Zeitpunkten, d.h. auch zu dem Wert von ZT 0. Dieser Wert liegt mit $3,3 \pm 0,37$ auf dem Niveau der Werte zu ZT 8 ($3,1 \pm 0,48$) und ZT 16 ($2,8 \pm 0,21$).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit dieser Methode klare Unterschiede in der *Per1*-Expression zu verschiedenen Tageszeiten gezeigt werden können, wobei ein Minimum zu ZT 20 zu sehen ist, während die Expression zu den anderen Zeitpunkten kein exaktes Maximum erkennen lässt. Die *Per1*-Expression im linken und rechten SCN war bei allen rhythmischen Tieren symmetrisch.

a)



b)

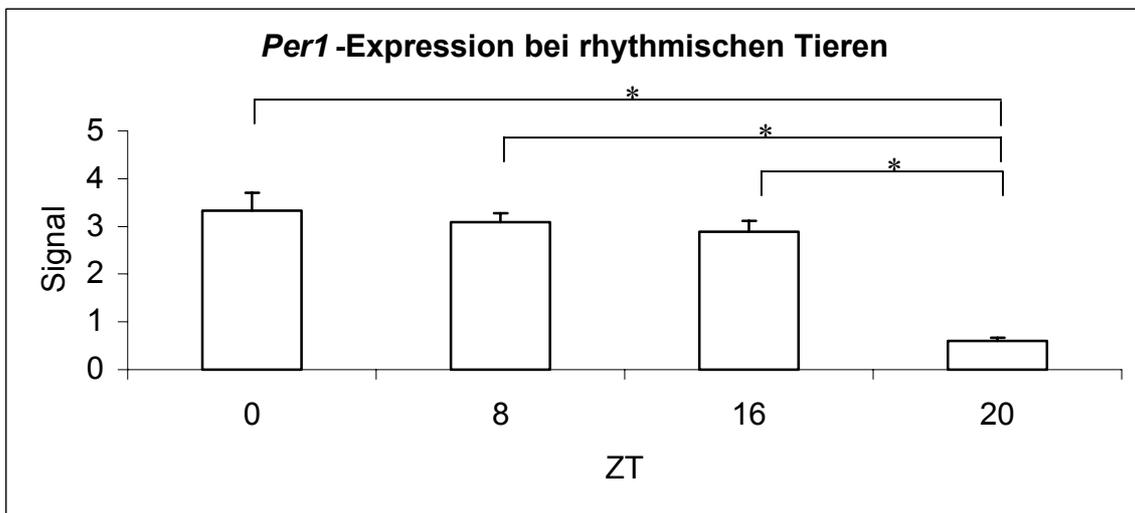


Abbildung 14:

Die *Per1*-Expression rhythmischer Dsugarischer Zwerghamster ermittelt über eine Maximum-Minimum-Analyse (a) und über visuelle subjektive Auswertung (b). Es sind die Mittelwerte mit dem Standardfehler für die Zeitpunkte ZT 0 (n = 9), ZT 8 (n = 18), ZT 16 (n = 9) und ZT 20 (n = 14) dargestellt. (* = $p < 0,05$)

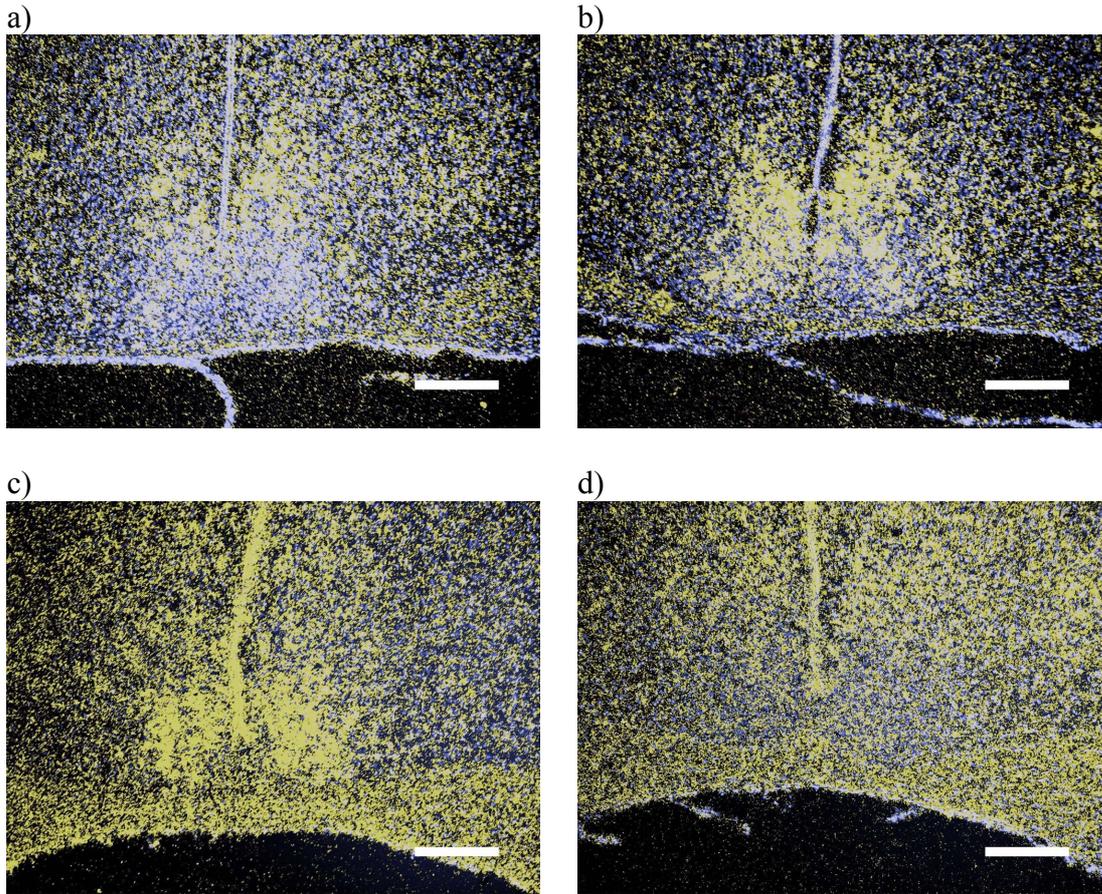


Abbildung 15:
Per1-Expression rhythmischer Tiere zum Zeitpunkt ZT0 (a), ZT8 (b), ZT16 (c) und ZT20 (d) (Balken = 200 μ m).

3.3.2 *Per1*-Expression bei arrhythmischen Tieren

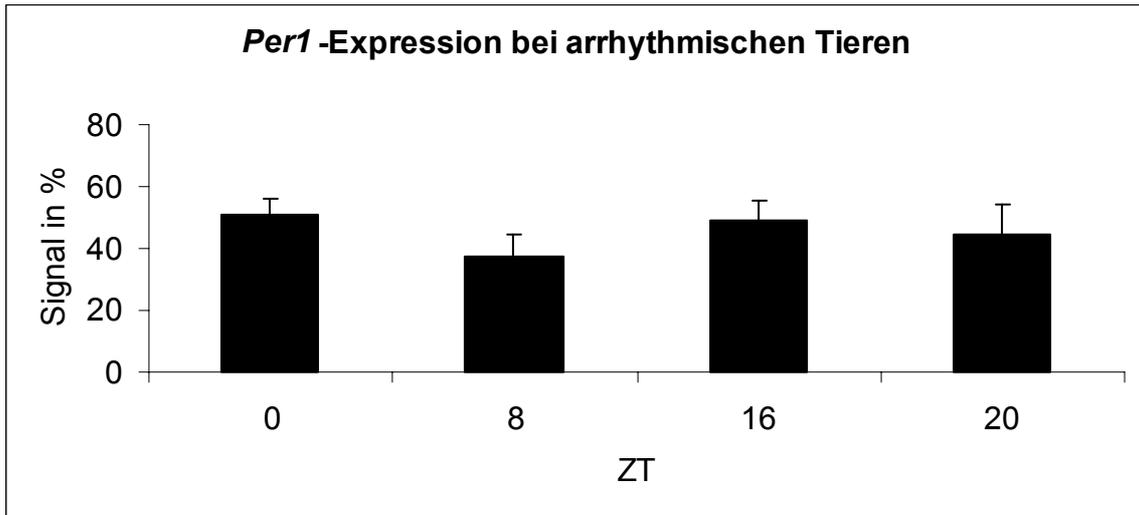
Auch bei den arrhythmischen Tieren wurden vier Zeitpunkte (ZT 0 n=6, ZT 8 n=8, ZT 16 n=8 und ZT 20 n=7) untersucht (Abbildung 16), um einen möglichen zeitlichen Verlauf in der *Per1*-Expression zu erfassen. In der visuellen Auswertung wurde zudem darauf geachtet, ob es Unterschiede in der Expression im rechten und linken SCN gab.

Die computergestützte Auswertung der *Per1*-Expression der arrhythmischen Tiere ergab Werte, die keinen signifikanten Unterschied zwischen ZT 0 ($51 \pm 5,1\%$), ZT 8 ($37 \pm 7,0\%$), ZT 16 ($49 \pm 6,2\%$) und ZT 20 ($44,5 \pm 9,5\%$) aufwiesen (Abbildung 16a).

Bei der subjektiven, optischen Auswertung ergab sich ein ähnliches Bild ohne signifikante Unterschiede (Abbildung 16b). Der Wert zu ZT 20 ($1,9 \pm 0,39$) ist hierbei jedoch etwas geringer als die Werte zu ZT 0 ($2,6 \pm 0,42$), ZT 8 ($2,4 \pm 0,48$) und ZT 16 ($3,0 \pm 0,21$). Bei der visuellen Auswertung konnte in keinem Fall eine unterschiedliche *Per1*-Expression im linken und rechten SCN festgestellt werden.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass keine signifikante Schwankung in den Messwerten für die *Per1*-Expression vorliegt.

a)



b)

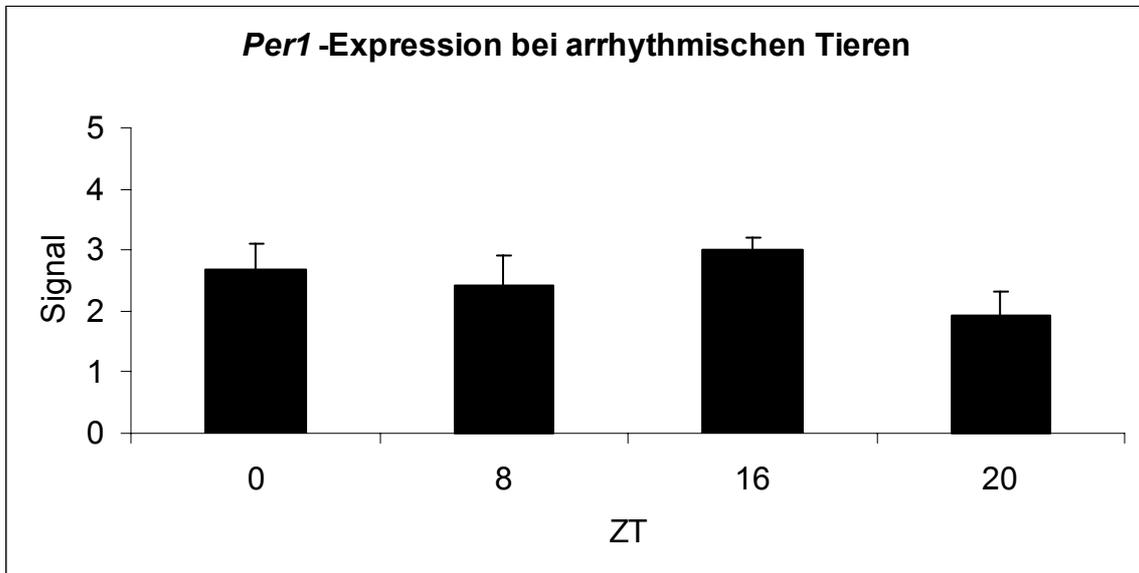


Abbildung 16:

Die *Per1*-Expression arrhythmischer Dsungarischer Zwerghamster ermittelt über eine Maximum-Minimum-Analyse (a) und über visuelle subjektive Auswertung (b). Es sind die Mittelwerte mit dem Standardfehler für die Zeitpunkte ZT 0 (n = 6), ZT 8 (n = 8), ZT 16 (n = 8) und ZT 20 (n = 7) dargestellt.

3.3.3 Vergleich der *Per1*-Expression bei rhythmischen und arrhythmischen Tieren

Um Veränderungen durch die Arrhythmie zu erfassen, wurde die *Per1*-Expression der rhythmischen und arrhythmischen Tiere verglichen (Abbildung 18).

Die computergestützte Auswertung der *Per1*-Expression der arrhythmischen Tiere wies wie erwähnt einen Wert von $44,5 \pm 9,5\%$ zum Zeitpunkt ZT 20 auf und war damit signifikant höher als der Wert der rhythmischen Tiere zu diesem Zeitpunkt ($22,4 \pm 5,0\%$) (Abbildung 18a). Zwischen den anderen Werten gab es keinen signifikanten Unterschied.

Bei der subjektiven, optischen Auswertung ergab sich ein ähnliches Bild. Der Wert zu ZT 20 ($1,9 \pm 0,39$) liegt deutlich höher als der Wert der rhythmischen Tiere zu diesem Zeitpunkt ($0,6 \pm 0,05$) (Abbildung 17 und 18b).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die *Per1*-Expression bei arrhythmischen Tieren zum Zeitpunkt ZT 20 nicht wie bei rhythmischen Tieren reduziert ist.

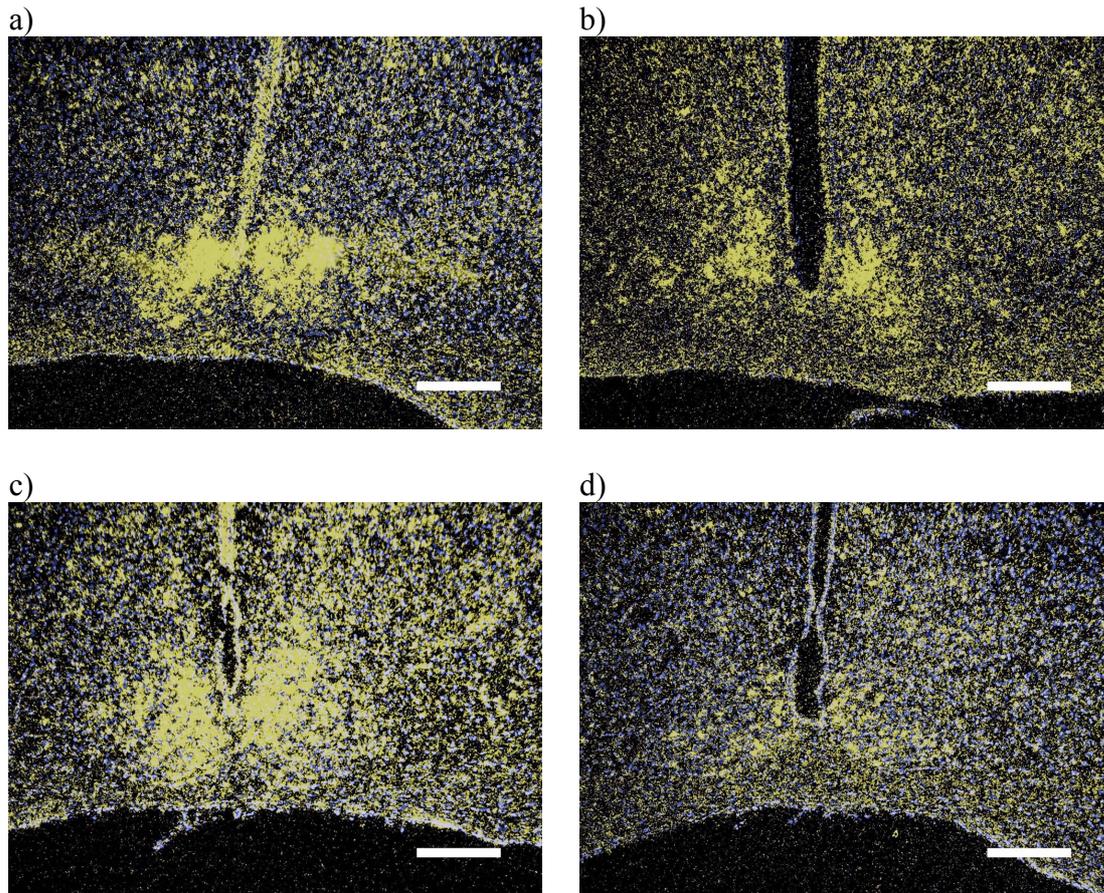
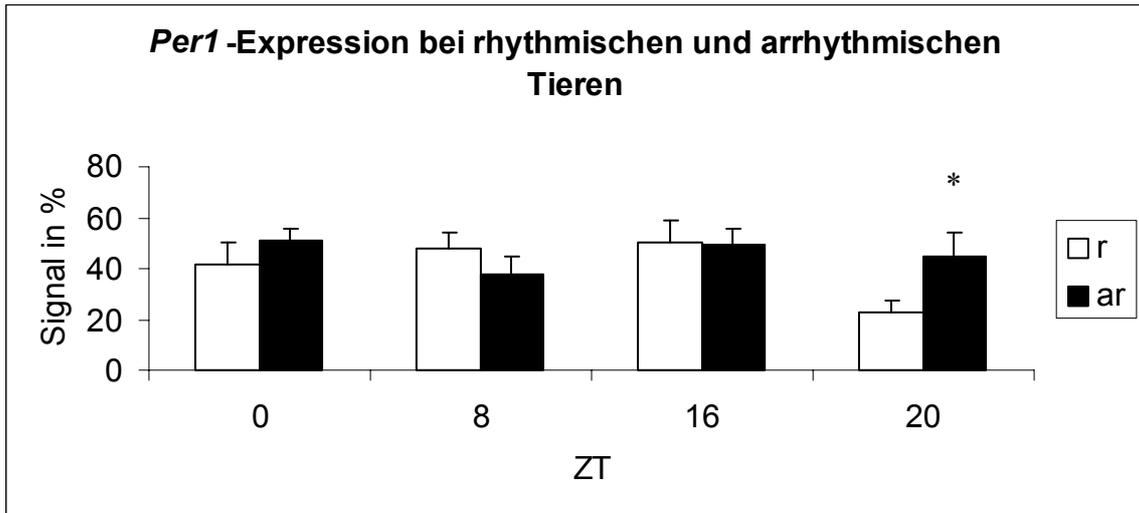


Abbildung 17:
Per1-Expression arrhythmischer Tiere zum Zeitpunkt ZT 20 (Balken = 200 μ m).

a)



b)

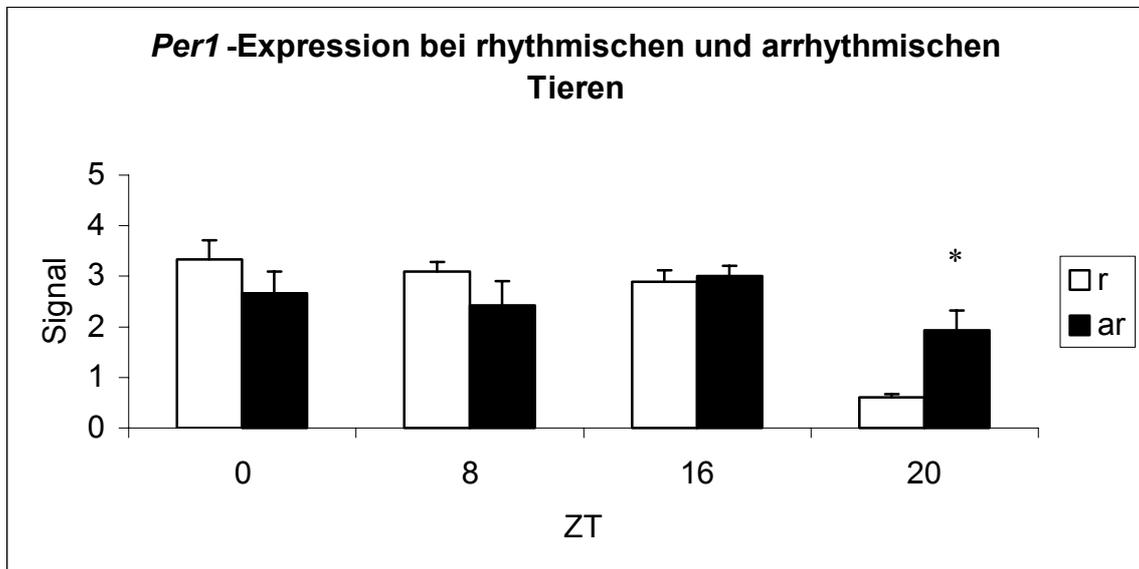


Abbildung 18:

Die *Per1*-Expression rhythmischer (r) und arrhythmischer (ar) Dsungarischer Zwerghamster ermittelt über die Maximum-Minimum-Analyse (a) und über die visuelle subjektive Auswertung (b) im Vergleich.

3.3.4 *Per2*-Expression bei rhythmischen Tieren

Für die Untersuchung der *Per2*-Expression wurden Parallelschnitte zu den Präparaten der *Per1-in situ*-Hybridisierung verwendet. Es sollte festgestellt werden, ob sich auch für die *Per2*-Expression eine Schwankung im Tagesgang zeigt (Abbildung 19). Durch die Verwendung von Parallelschnitten konnte ein Vergleich mit den Ergebnissen aus der Untersuchung der *Per1*-Expression unternommen werden. In der visuellen Auswertung wurde zudem darauf geachtet, ob es Unterschiede in der Expression im rechten und linken SCN gab.

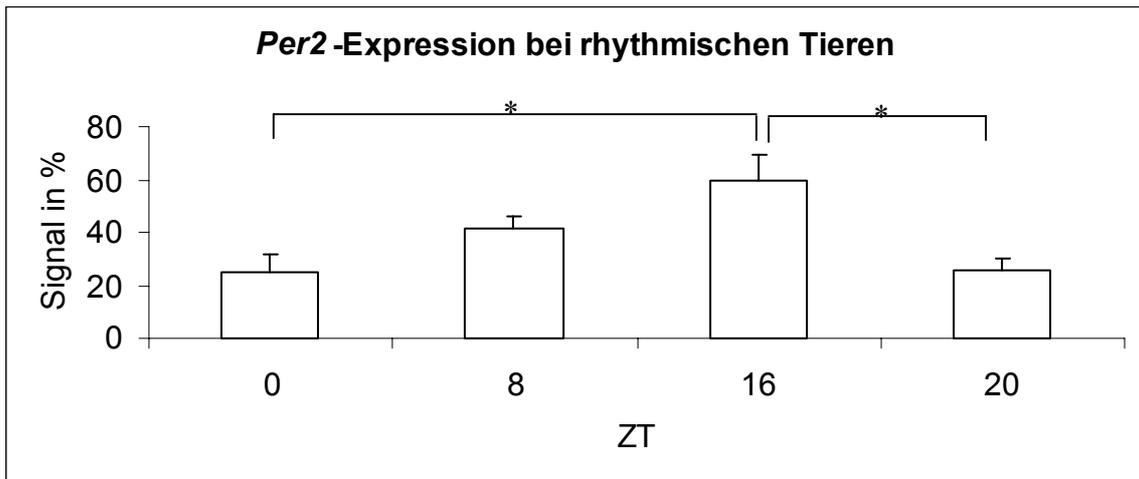
Zuerst wurde auch hier die computergestützte Auswertung durchgeführt. Diese ergab folgende Mittelwerte: $25 \pm 6,8\%$ für den Zeitpunkt ZT 0, $41 \pm 5,0\%$ für ZT 8, $59 \pm 9,8$ für ZT 16 und $26 \pm 4,5\%$ für ZT 20. Somit unterschieden sich die Werte der Zeitpunkte ZT 0, ZT 8 und ZT 20 nicht signifikant. Der Wert von ZT 16 war aber signifikant höher als die Werte von ZT 0 und ZT 20. Der Wert von ZT 8 zeigte zu keinem Wert einen signifikanten Unterschied. Somit war die *Per2*-Expression zum Zeitpunkt ZT 0 minimal, zu ZT 8 intermediär, zu ZT 16 maximal und zu ZT 20 wiederum minimal (Abbildung 19a).

Die subjektive, optische Auswertung (Abbildung 19b und 20) konnte bestätigen, dass ZT 0 ($0,3 \pm 0,15$) und ZT 20 ($1,3 \pm 0,27$) die geringsten Werte aufwies. Doch waren sie nicht nur signifikant geringer als der Wert von ZT 16 ($4,0 \pm 0,11$), sondern auch als der Wert von ZT 8 ($3,8 \pm 0,12$). Somit erhielt man bei diesem Verfahren keinen intermediären Wert für ZT 8.

Auch wenn die beiden Auswertungen in einzelnen Details unterschiedlich sind, lässt sich als Ergebnis festhalten, dass die *Per2*-Expression einer tageszeitlichen Schwankung unterworfen ist, die ein Maximum in Bereich von ZT 16 hat und deren Minimum bei ZT 20 und auch bei ZT 0 liegt. Verglichen mit der *Per1*-Expression lässt sich feststellen, dass das Minimum zu zwei Zeitpunkten erfasst wird. Die *Per2*-Expression im linken und rechten SCN war bei allen rhythmischen Tieren symmetrisch.

Bei dem Vergleich der mittels Computer erhaltenen Ergebnisse für die Parallelschnitte ließ sich keine klare Verbindung zwischen dem Zeitpunkt und dem Verhältnis von *Per1*- zu *Per2*-Expression ermitteln. Zu allen Zeitpunkten gab es sowohl Tiere, deren *Per1*-Expression stärker war als auch Tiere, bei denen die *Per2*-Expression stärker war.

a)



b)

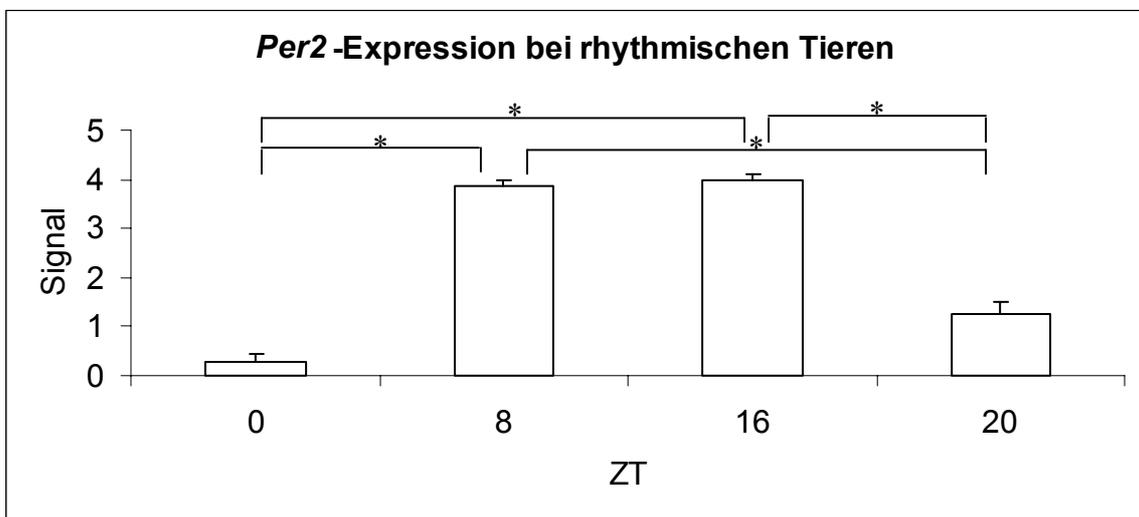


Abbildung 19:

Die *Per2*-Expression rhythmischer (r) Dsungarischer Zwerghamster ermittelt über die Maximum-Minimum-Analyse (a) und über die visuelle subjektive Auswertung (b). Es sind die Mittelwerte mit dem Standardfehler für die Zeitpunkte ZT 0 (n = 9), ZT 8 (n = 18), ZT 16 (n = 9) und ZT 20 (n = 14) dargestellt.

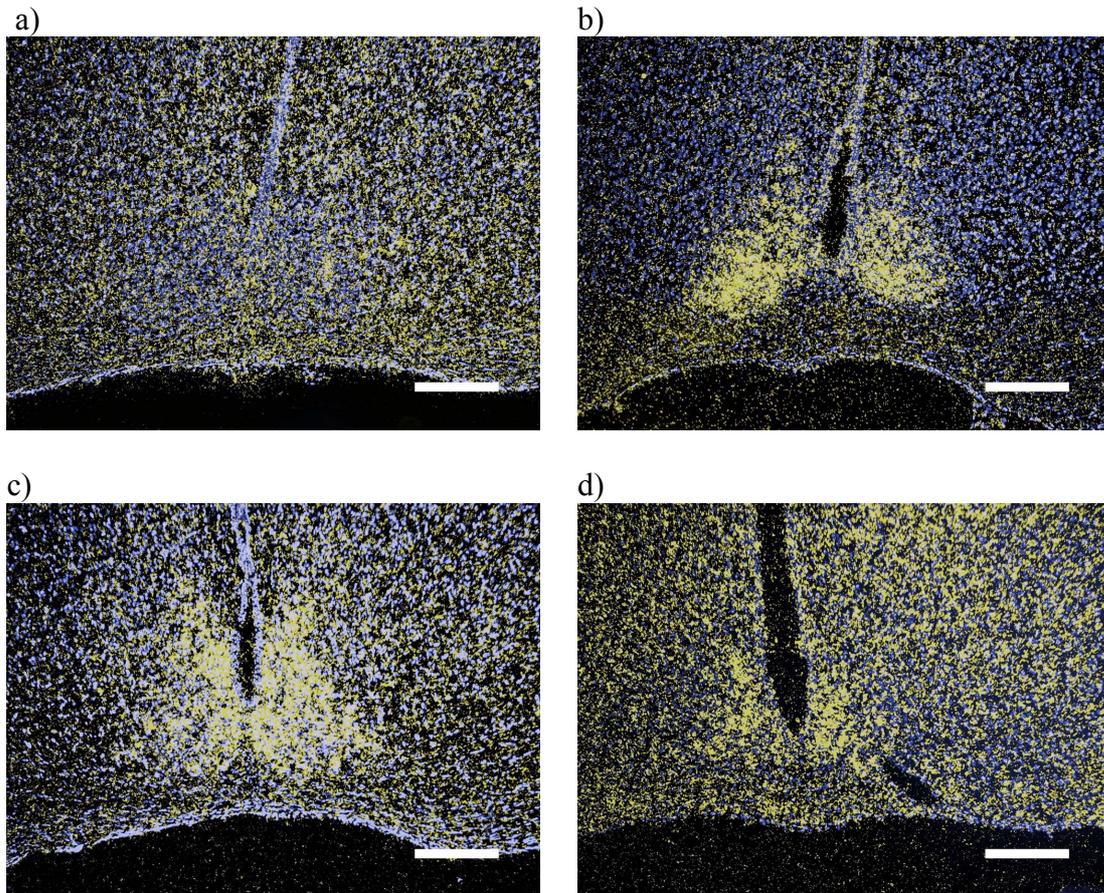


Abbildung 20:
Per2-Expression rhythmischer Tiere zum Zeitpunkt ZT 0 (a), ZT 8 (b), ZT 16 (c) und ZT 20 (d) (Balken = 200 μ m).

3.3.5 *Per2*-Expression bei arrhythmischen Tieren

Wie bei den rhythmischen fanden auch bei den arrhythmischen Tieren die Parallelschnitte der Präparate der *Per1-in situ*-Hybridisierung Verwendung. Es wurde untersucht, ob sich für die *Per2*-Expression bei arrhythmischen Tieren eine Schwankung im Tagesgang zeigt (Abbildung 21). In der visuellen Auswertung wurde zudem darauf geachtet, ob es Unterschiede in der Expression im rechten und linken SCN gab.

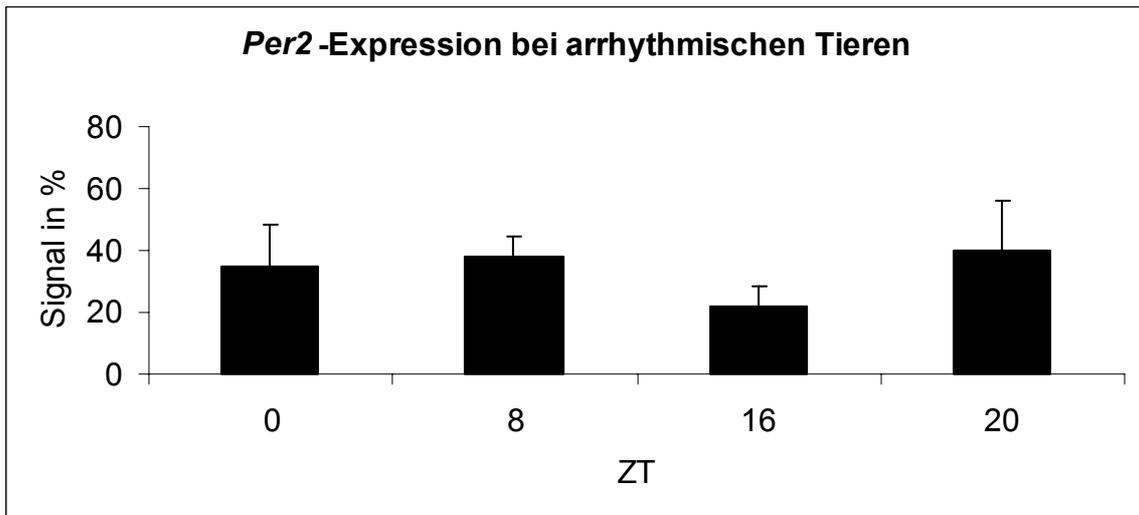
Die Auswertung mittels Computer wurde auch hier der subjektiven Auswertung vorangestellt. Die Werte unterschieden sich nicht signifikant (ZT 0 = $34 \pm 13,6\%$, ZT 8 = $37 \pm 6,5\%$, ZT 16 = $21 \pm 6,4\%$ und ZT 20 = $40 \pm 15,6\%$). Es gab keine Schwankung im Tagesgang (Abbildung 21a).

Auch bei der subjektiven Auswertung ist keine Rhythmik zu erkennen, denn die Werte für die Zeitpunkte ZT 0 ($2,9 \pm 0,41$), ZT 8 ($3,5 \pm 0,13$), ZT 16 ($3,2 \pm 0,30$) und ZT 20 ($3,0 \pm 0,45$) unterschieden sich nicht signifikant (Abbildung 21b).

Somit ist mit beiden Methoden gezeigt, dass sich keine tageszeitlichen Unterschiede in der *Per2*-Expression für die arrhythmischen Tiere nachweisen lassen.

Bei der visuellen Auswertung konnte in einem Fall eine unterschiedliche *Per2*-Expression im linken und rechten SCN festgestellt werden (Abbildung 22a). Hierbei war die Expression im linken SCN deutlich stärker als im rechten SCN. Ein Vergleich mit der *Per1*-Expression im Parallelschnitt zeigte, dass dort kein Unterschied zwischen dem rechten und dem linken SCN zu sehen war (Abbildung 22b).

a)



b)

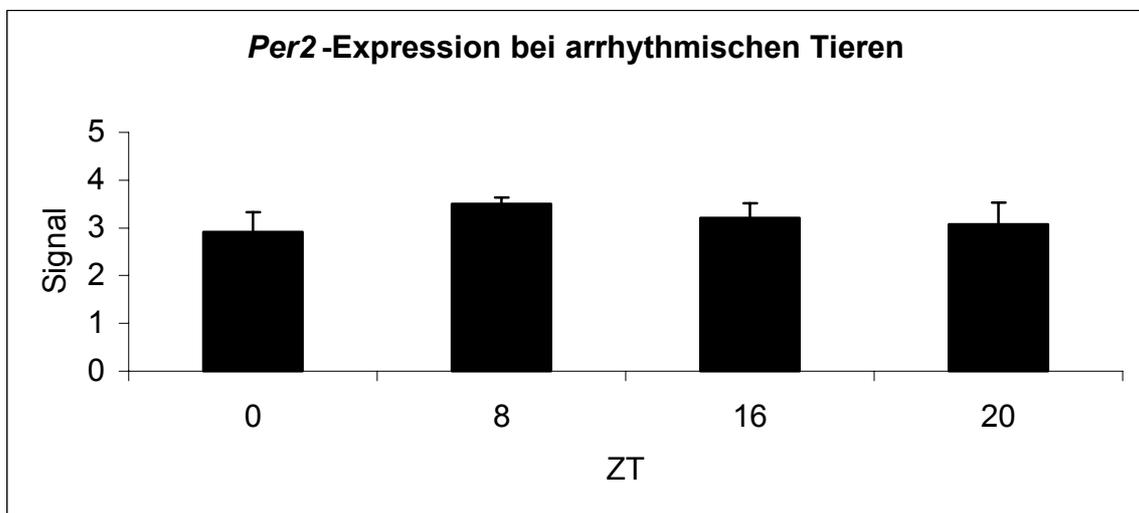
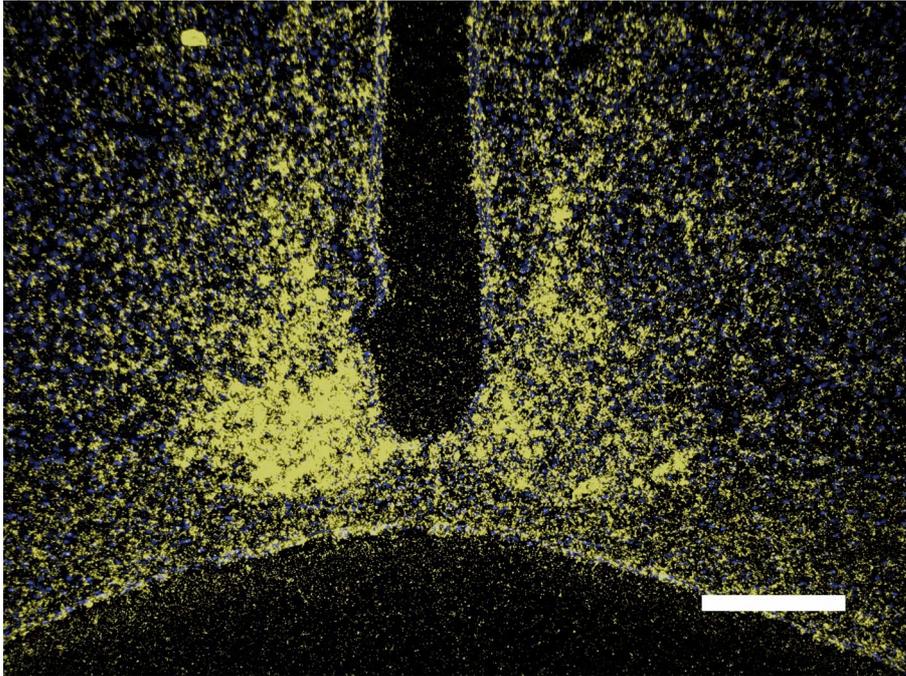


Abbildung 21:

Die *Per2*-Expression arrhythmischer Dsugarischer Zwerghamster ermittelt über eine Maximum-Minimum-Analyse (a) und über visuelle subjektive Auswertung (b). Es sind die Mittelwerte mit dem Standardfehler für die Zeitpunkte ZT 0 (n = 6), ZT 8 (n = 8), ZT 16 (n = 8) und ZT 20 (n = 7) dargestellt.

a)



b)

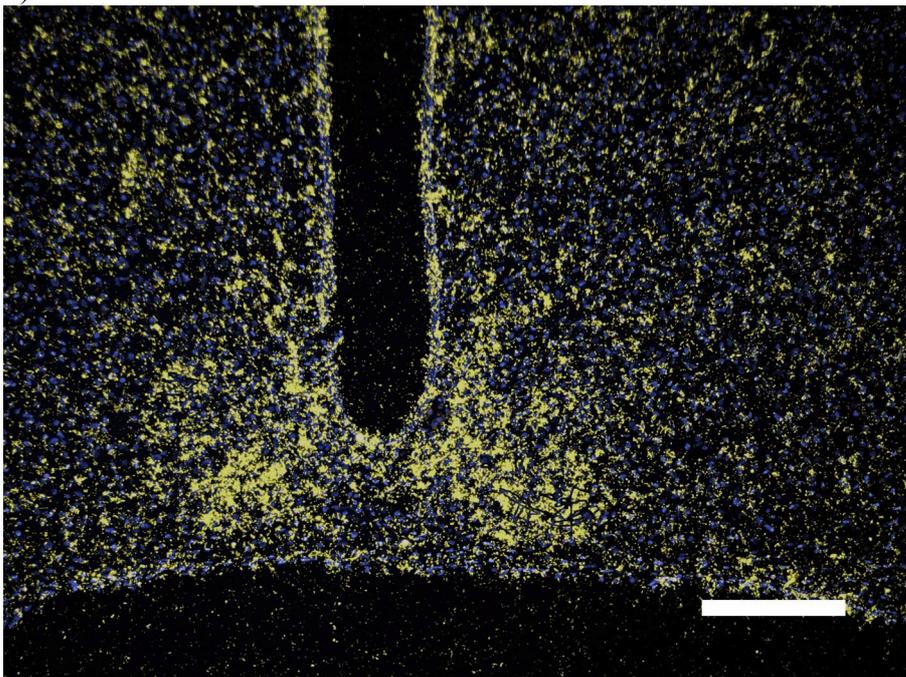


Abbildung 22:

Per2-Expression (a) eines arrhythmischen Tieres mit der Besonderheit einer asymmetrischen Verteilung: Der rechte SCN zeigt ein erheblich stärkeres Signal als der linke SCN. Für die *Per1*-Expression (b) ist diese Asymmetrie nicht zu sehen.

3.3.6 Vergleich der *Per2*-Expression bei rhythmischen und arrhythmischen Tieren

Die *Per2*-Expression der rhythmischen und arrhythmischen Tiere wurde verglichen, um Veränderungen durch die Arrhythmie zu erfassen (Abbildung 24).

Die Auswertung mittels Computer zeigte, dass der Wert der arrhythmischen Tiere von ZT 16 ($21 \pm 6,4 \%$) signifikant geringer als der Wert bei den rhythmischen Tieren zu diesem Zeitpunkt ($59 \pm 9,8 \%$) war (Abbildung 24a). Die Werte der übrigen drei Zeitpunkte unterschieden sich wiederum nicht signifikant zwischen den rhythmischen und arrhythmischen Tieren (Abbildung 24a). Diese drei Werte der arrhythmischen Tiere liegen zwar unter dem Maximum, sind aber nicht signifikant reduziert.

Bei der subjektiven Auswertung (Abbildung 24b) liegen die Werte der arrhythmischen Tiere für die Zeitpunkte ZT 0 ($2,9 \pm 0,41$) (Abbildung 23) und ZT 20 ($3,0 \pm 0,45$) signifikant höher als die Werte der rhythmischen Tiere. Die Werte zu den Zeitpunkten ZT 8 ($3,5 \pm 0,13$) und ZT16 ($3,2 \pm 0,30$) liegen auf dem Niveau der rhythmischen Tiere.

Beide Auswertungen zeigen, dass die Werte zu ZT 0 und ZT 20 bei den arrhythmischen Tieren erhöht sind. Dies ist allerdings nur bei der visuellen Auswertung signifikant. Die in der visuellen Auswertung nur leichte Verringerung des Wertes zu ZT 16 bei den arrhythmischen Tieren ist in der computergestützten Auswertung ein deutlicher, signifikanter Unterschied.

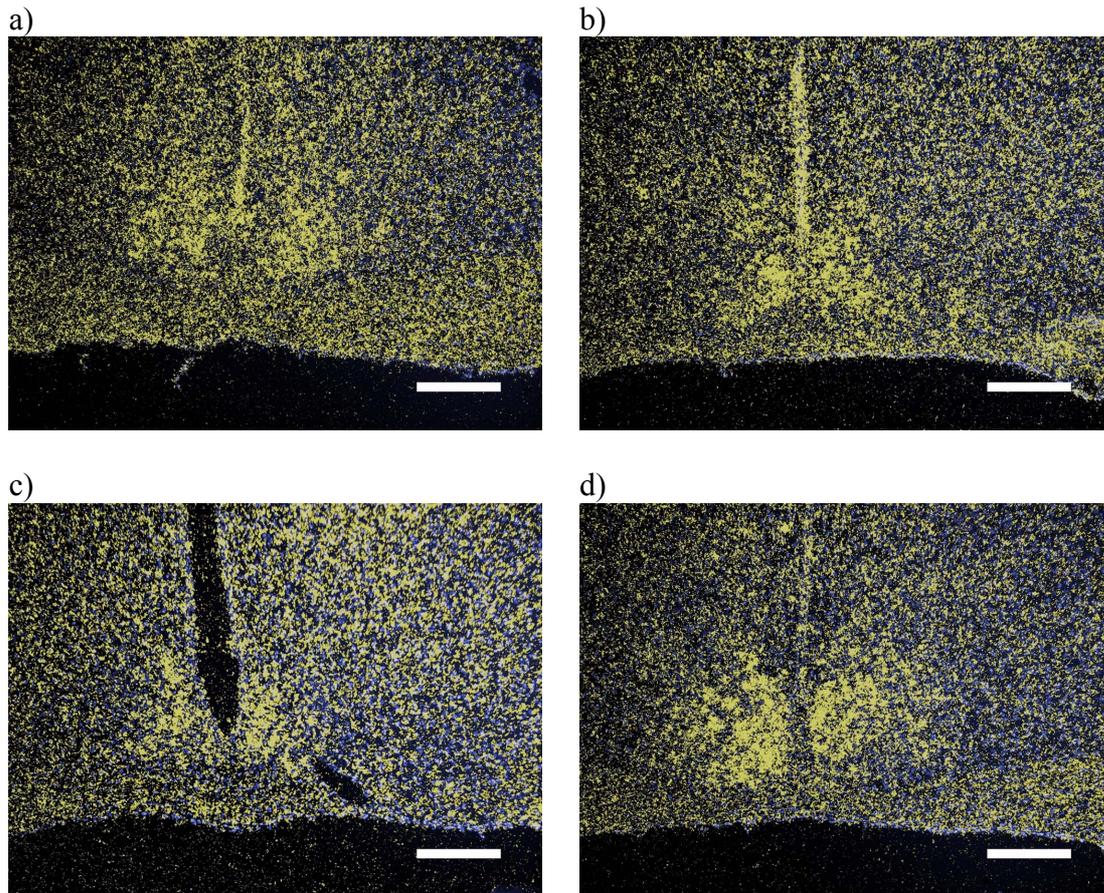
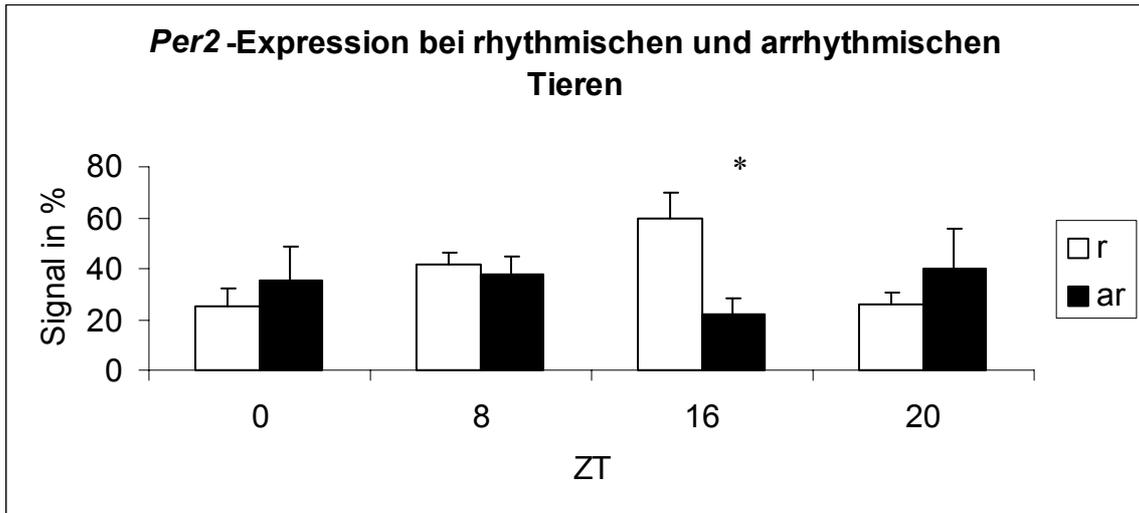


Abbildung 23:
Per2-Expression arrhythmischer Tiere zum Zeitpunkt ZT0 (a-d) (Balken = 200μm).

a)



b)

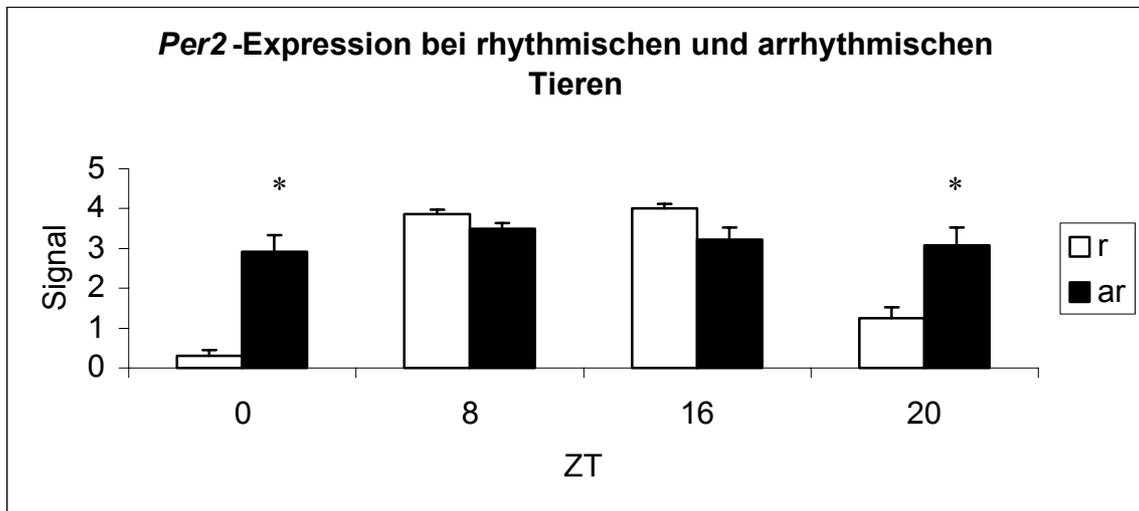


Abbildung 24:

Die *Per2*-Expression arrhythmischer (ar) und rhythmischer (r) Dsungarischer Zwerghamster ermittelt über die Maximum-Minimum-Analyse (a) und über die visuelle subjektive Auswertung (b).

3.4 Immunhistologischer Nachweis von NPY

Der IGL innerviert den SCN mit Axonen, die den Neurotransmitter NPY ausschütten. Da der IGL photische, vor allem aber nichtphotische Stimuli an das circadiane System weiterleitet, war es von Interesse zu untersuchen, ob in dieser Verschaltung durch lichtinduzierte Arrhythmie Veränderungen auftreten. Verwendung fanden hierfür Parallelschnitte der Präparate aus der *in situ*-Hybridisierung. Diese wurden immunhistochemisch unter Verwendung eines Antikörpers gegen Neuropeptid Y (NPY) untersucht.

Die Auswertung der Immunreaktivitäten erfolgte lichtmikroskopisch im Hellfeld. Die Ausdehnung des immunhistochemischen Signals gegen NPY wurde in drei Stufen unterteilt (siehe Material und Methoden, Abbildung 2). Der Stufe 0 wurden die Schnitte zugeordnet, die kein Signal im SCN enthielten. Schnitte mit einem immunhistochemischen Signal gegen NPY im ventralen Bereich des SCN entsprachen der Stufe 1. Gab es im gesamten SCN immunhistochemisches Signal gegen NPY, entsprach dies der Stufe 2. Auch bei Stufe 2 war das Signal ventral deutlicher.

Bei der Aufteilung in rostral, medial und caudal fiel auf, dass es niemals ein Signal der Stufe 2 im rostralen oder caudalen Bereich gab, ohne dass im medialen Bereich zumindest ein Signal der Stufe 1 vorlag. Zum Vergleich der Gruppen wurden Mittelwert und Standardfehler für die definierten Stufen bestimmt.

3.4.1 Bei rhythmischen Tieren

Mit der Untersuchung der Ausdehnung des immunhistochemischen Signals gegen NPY in der Gruppe der rhythmischen Tiere wurde überprüft, ob es einen zeitlichen Verlauf in seiner Ausprägung aufweist (Abbildung 25). Dabei wurden der rostrale, der mediale und der caudale Bereich getrennt ausgewertet.

Die Signalausdehnung im rostralen SCN war zum Zeitpunkt ZT 0 ($0,30 \pm 0,21$) zwar geringer als zu ZT 8 ($0,44 \pm 0,17$), ZT 16 ($0,55 \pm 0,25$) und ZT 20 ($0,57 \pm 0,20$), aber bei der hohen Streuung der Werte ist dieser Unterschied nicht signifikant (Abbildung 25a). Somit kann festgestellt werden, dass im rostralen Bereich zwar zu jedem Zeitpunkt Individuen mit ausgedehntem immunhistochemischen Signal gegen NPY gefunden werden können, es aber insgesamt wenig Signalausdehnung gibt.

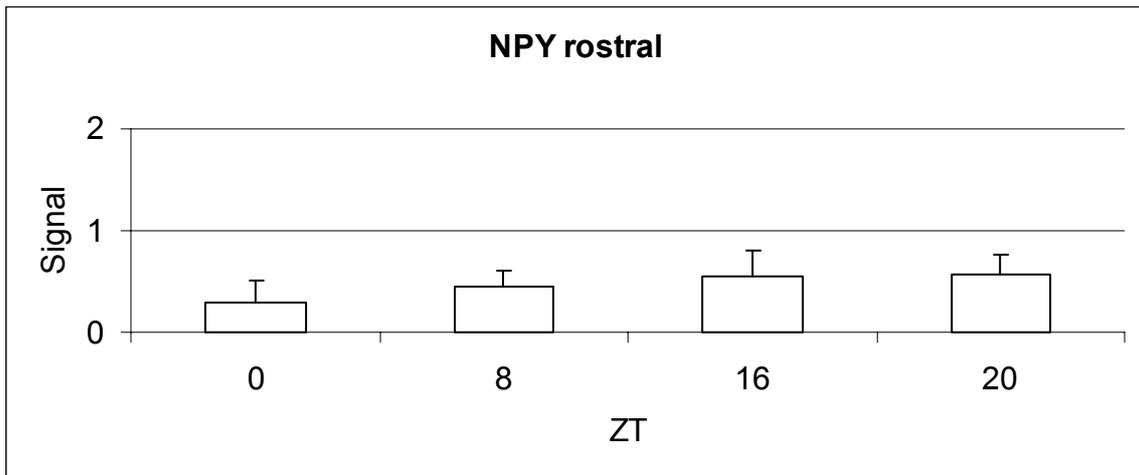
Im medialen Bereich des SCN entspricht die Signalausdehnung häufiger den Stufen 1 und 2. Der Wert zu ZT 0 ($1,7 \pm 0,15$) bildet dabei ein Maximum gegenüber den Werten zu ZT 8 ($1,3 \pm 0,16$), ZT 16 ($1,2 \pm 0,28$) und ZT 20 ($1,5 \pm 0,20$). Der

Standardfehler ist zwar geringer als für die Werte im rostralen Bereich, bewirkt aber auch hier das Fehlen von Signifikanzen (Abbildung 25b). Auch die medialen Schnitte lassen somit keine Aussage über den Tagesgang zu. Generell ist die Signalausdehnung des Antikörpers gegen NPY aber im medialen Bereich häufiger der Stufe 1 und 2 zuzuordnen als im rostralen Bereich, auch wenn es zu jedem Zeitpunkt Individuen ohne Signal im SCN gibt.

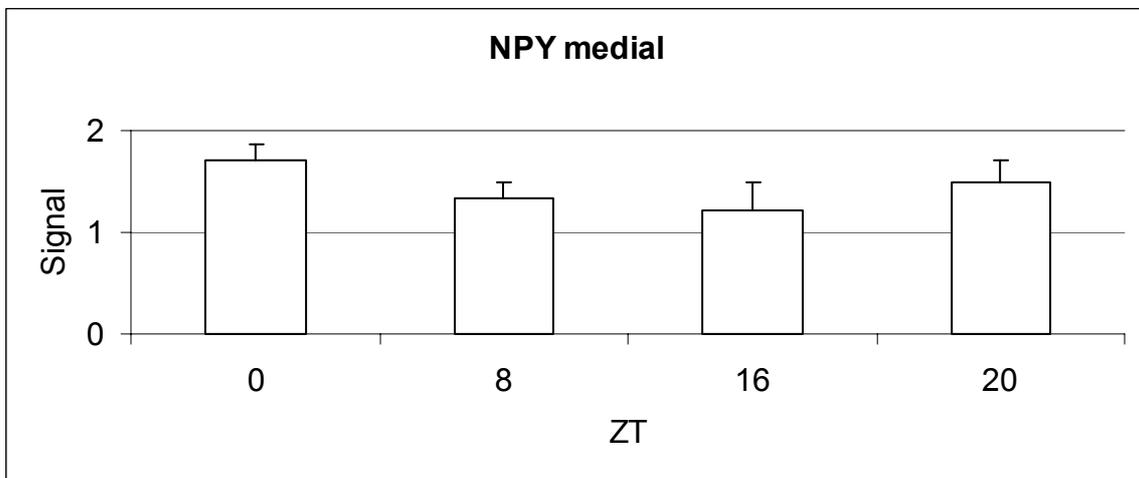
Zum Zeitpunkt ZT 0 ($0,90 \pm 0,31$) und ZT 8 ($0,94 \pm 0,21$) war die Signalausdehnung im caudalen Bereich des SCN geringer als zu ZT 16 ($1,3 \pm 0,33$) und ZT 20 ($1,21 \pm 0,24$). Jedoch relativiert auch hier die hohe Streuung die Aussage (Abbildung 25c). Im caudalen Bereich sind ebenfalls alle Stufen der Signalausdehnung zu allen Zeitpunkten aufgetreten.

Das immunhistochemische Signal gegen NPY konnte in verschiedenen Klassifizierungen der Ausdehnung erfasst werden, aber auch bei der Betrachtung der unterschiedlichen SCN-Regionen (rostral, medial und caudal) ließ sich kein zeitlicher Verlauf erfassen.

a)



b)



c)

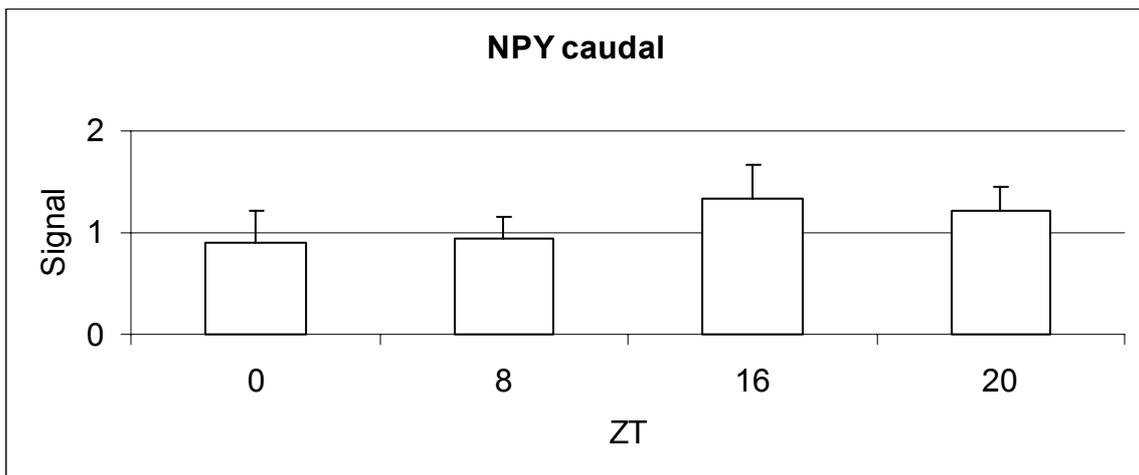


Abbildung 25:

Immunpositives Signal gegen NPY bei rhythmischen (r) Dsungarischen Zwerghamstern zu den Zeitpunkten ZT 0, ZT 8, ZT 16 und ZT 20. Der SCN wurde für den rostralen (a), medialen (b) und caudalen (c) Bereich getrennt betrachtet.

3.4.2 Bei arrhythmischen Tieren

In der Gruppe der arrhythmischen Tiere sollte die Untersuchung der Ausdehnung des immunhistochemischen Signals gegen NPY zeigen, ob es einen Unterschied zwischen den Werten zu den verschiedenen Zeitpunkten gibt (Abbildung 26). Dabei wurden der rostrale, der mediale und der caudale Bereich des SCN getrennt ausgewertet.

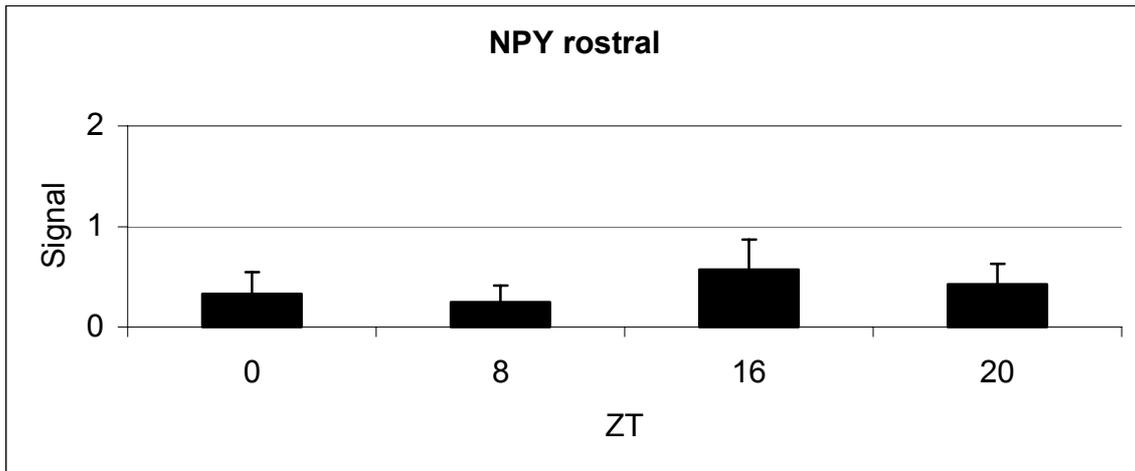
Im rostralen Bereich lagen alle Werte (ZT 0 ($0,33 \pm 0,21$), ZT 8 ($0,25 \pm 0,16$), ZT 16 ($0,57 \pm 0,30$) und ZT 20 ($0,43 \pm 0,20$)) auf einem Niveau. Die Werte von ZT 0 und ZT 8 fielen zwar etwas geringer aus als die anderen, aber dieser Unterschied war nicht signifikant (Abbildung 26a).

Die Werte im medialen Bereich des SCN unterschieden sich mit $1,3 \pm 0,33$ (ZT 0), $1,2 \pm 0,23$ (ZT 8), $1,3 \pm 0,29$ (ZT 16) und $1,4 \pm 0,34$ (ZT 20) nicht signifikant voneinander (Abbildung 26b).

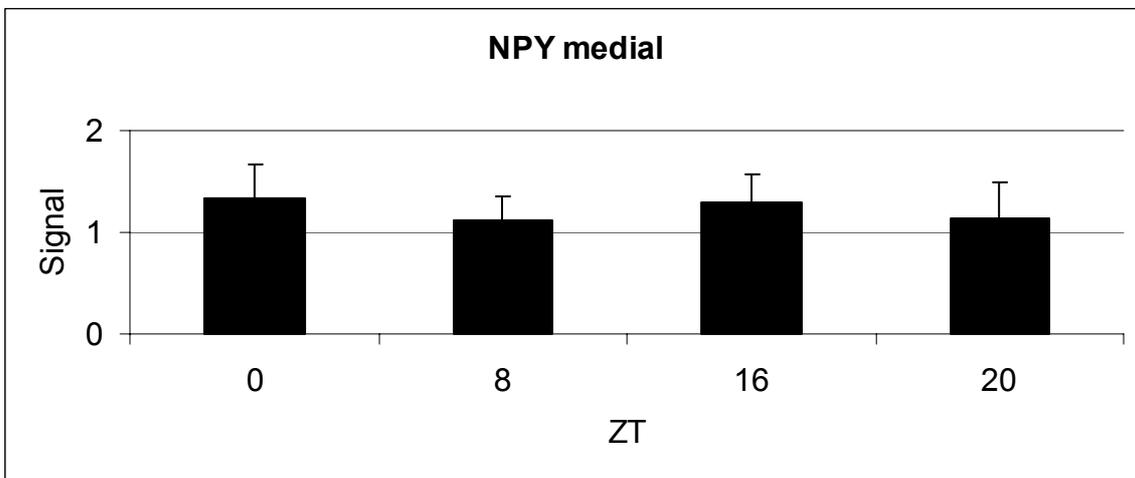
Im caudalen Bereich war der Wert zu ZT 0 ($0,50 \pm 0,34$) der geringste, wobei auch die Werte zu ZT 8 ($0,63 \pm 0,34$), ZT 16 ($0,71 \pm 0,36$) und ZT 20 ($0,71 \pm 0,36$) nicht signifikant höher ausfielen (Abbildung 26c).

Die Ausdehnung des immunhistochemischen Signals gegen NPY zeigte bei den arrhythmischen Tieren keine tageszeitliche Veränderung.

a)



b)



c)

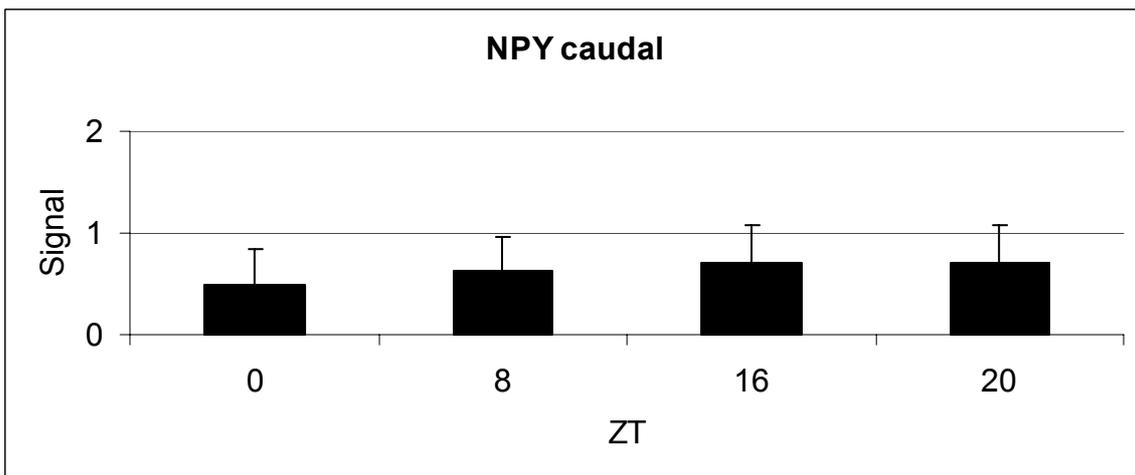


Abbildung 26:

Immunpositives Signal gegen NPY bei arrhythmischen (ar) Dsungarischen Zwerghamstern zu den Zeitpunkten ZT 0, ZT 8, ZT 16 und ZT 20. Der SCN wurde für den rostralen (a), medialen (b) und caudalen (c) Bereich getrennt betrachtet.

3.4.3 Vergleich der rhythmischen und arrhythmischen Tiere

Die Werte der rhythmischen und arrhythmischen Tiere wurden verglichen, um mögliche Unterschiede zu erfassen (Abbildung 27).

Im rostralen Bereich war der Wert der arrhythmischen Tiere zu ZT 0 fast identisch mit dem Wert der rhythmischen Gruppe für den gleichen Zeitpunkt, aber auch die Werte zu ZT 16 und ZT 20 zeigten keine Tendenz, sich von ihrem Pendant zu unterscheiden. Der Wert der arrhythmischen Tiere von ZT 8 lässt eine Verringerung der Signalausdehnung erahnen, doch bei einem Standardfehler von 64% des Wertes ist keine Reproduzierbarkeit zu erwarten (Abbildung 27a).

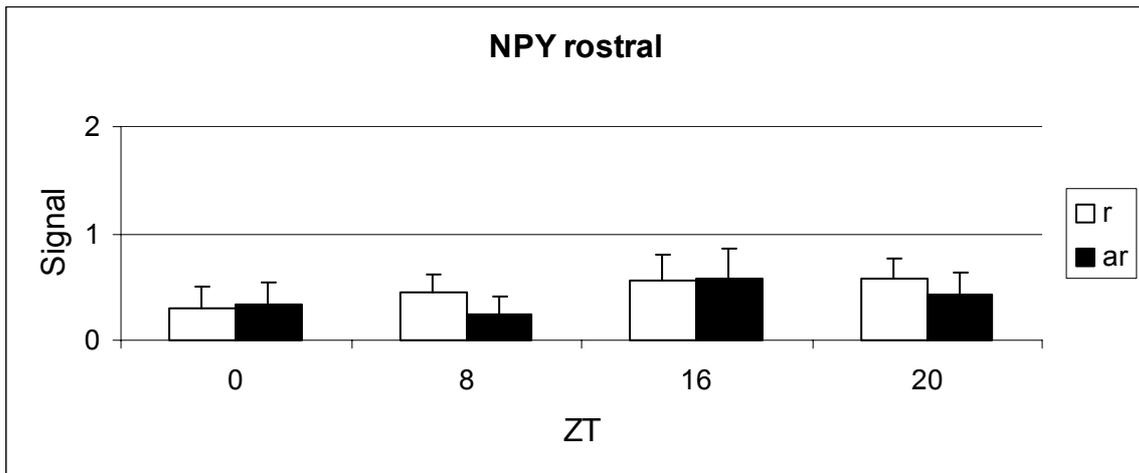
Die Werte im medialen Bereich des SCN waren für die arrhythmischen Tiere im gleichen Bereich wie für die rhythmischen Tiere angesiedelt. Die Unterschiede sind bei einem Standardfehler von 18-30% der Werte nicht signifikant (Abbildung 26b).

Im caudalen Bereich sind die Werte der arrhythmischen Tiere etwas geringer als die der rhythmischen. Durch den hohen Standardfehler sind auch diese Unterschiede nicht signifikant (Abbildung 27c).

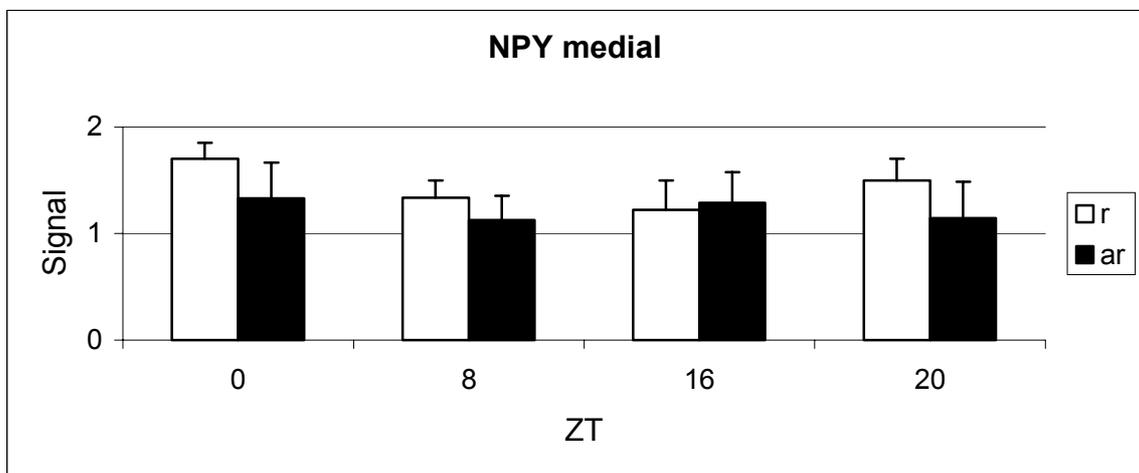
Zusammengefasst ergaben sich aus den immunhistologischen Untersuchungen zur Lokalisation von NPY im SCN folgende Ergebnisse:

- Erstens ließen sich die verschiedenen Klassifizierungen der Ausdehnung des immunhistochemischen Signals gegen NPY, wie sie bei rhythmischen Tieren gezeigt wurden, unterscheiden.
- Zweitens zeigte das immunhistochemische Signal gegen NPY unter den vorgegebenen Versuchsbedingungen keine zeitlichen Unterschiede.
- Drittens konnte im Vergleich mit den rhythmischen Tieren eine Verringerung des Signals im caudalen Bereich des SCN vermutet werden, dies ist aber nur eine Tendenz.

a)



b)



c)

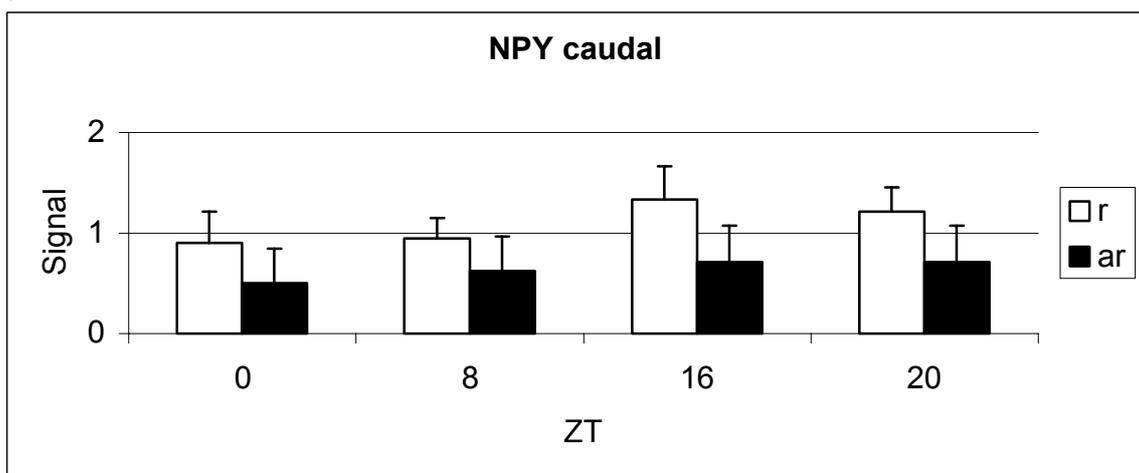


Abbildung 27:

Immunpositives Signal gegen NPY bei arrhythmischen (ar) und rhythmischen (r) Dsungarischen Zwerghamstern zu den Zeitpunkten ZT 0, ZT 8, ZT 16 und ZT 20. Der SCN wurde für den rostralen (a), medialen (b) und caudalen (c) Bereich getrennt betrachtet.

3.5 Vergleich der histologischen Ergebnisse mit der Aktivität

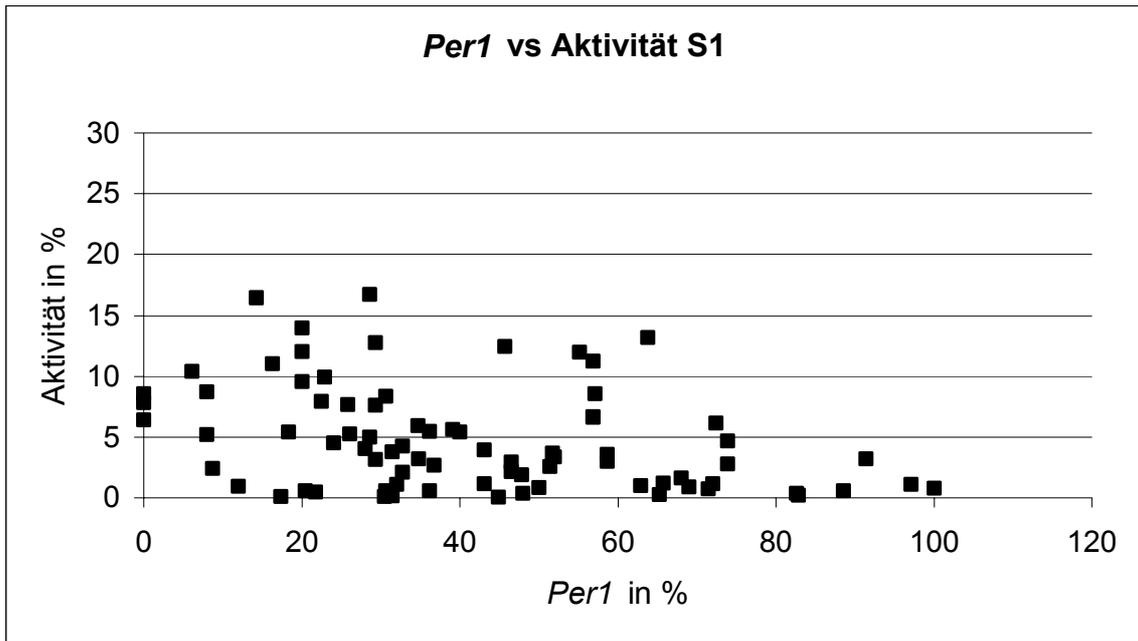
Die histologischen Ergebnisse wurden mit der Aktivität der Tiere vor der Tötung verglichen. Ziel dieses Vergleichs war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen der starken Streuung der Werte in der Histologie und der individuellen Aktivität zu finden oder auszuschließen.

Für alle Tiere wurde die Aktivität der letzten fünf Tage vor der Tötung untersucht. Dazu wurde der Mittelwert der Aktivität dieser Tage eine Stunde vor (S1) und nach (S2) der Tageszeit der späteren Tötung ermittelt und als prozentualer Wert der Gesamtaktivität in die Auswertung genommen.

3.5.1 *Per1*-Expression vs. Aktivität

Um zu erfassen, ob der Wert von S1 einen Einfluss auf die *Per1*-Expression hat, wurde er mit dem Wert aus der computergestützten Auswertung der *Per1*-Expression verglichen (Abbildung 28a). Eine Regressions-Analyse mit StatView zeigte, dass es keinen Zusammenhang gibt. Desgleichen wurde auch der Wert S2 mit dem Wert aus der computergestützten Auswertung der *Per1*-Expression verglichen (Abbildung 28b). Die Regressions-Analyse konnte wiederum keine Korrelation erfassen.

a)



b)

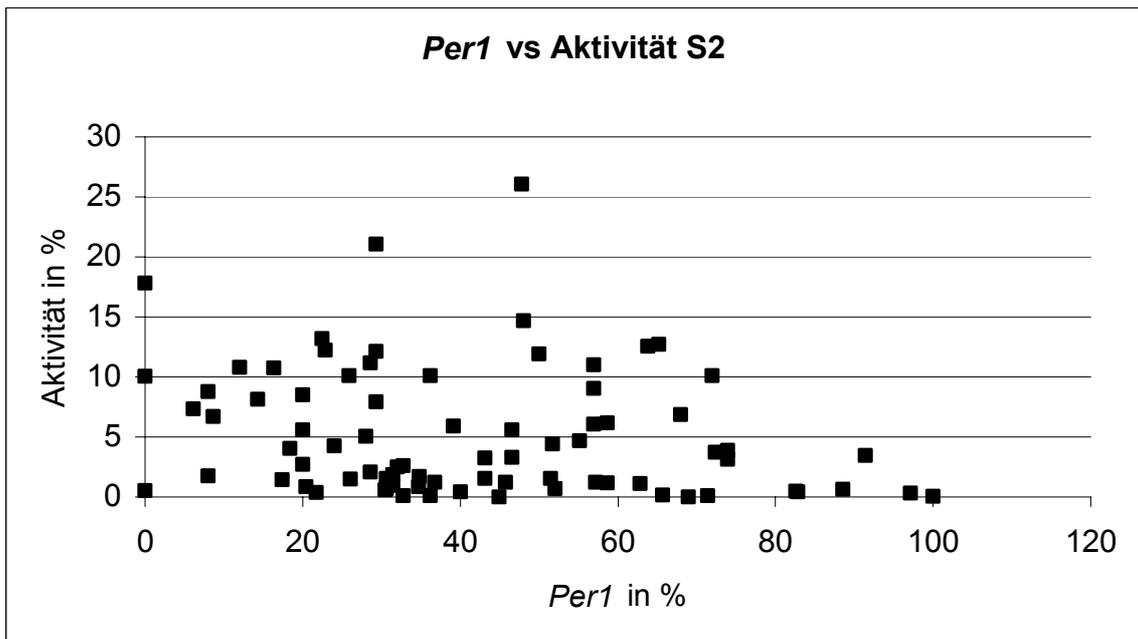


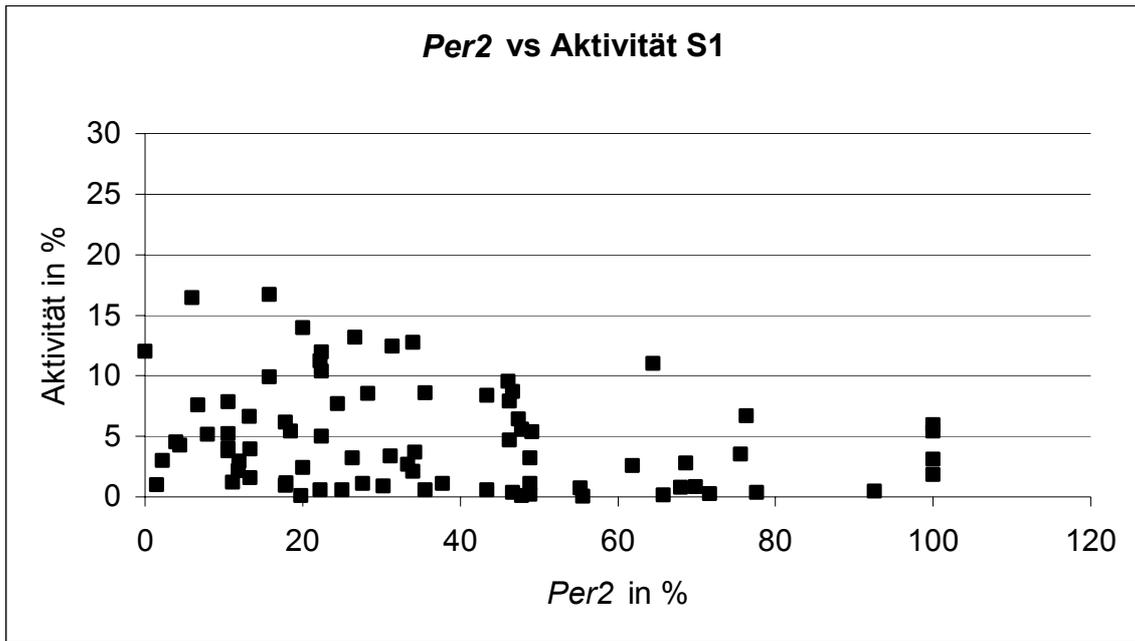
Abbildung 28:

Aktivität S1 (a) und S2 (b) in Abhängigkeit der *Per1*-Expression, wie sie die computergestützte Auswertung ergab. Die Aktivität ist in Prozent der täglichen Gesamtaktivität angegeben.

3.5.2 *Per2*-Expression vs. Aktivität

Wie für die *Per1*-Expression sollte auch für die *Per2*-Expression ein möglicher Zusammenhang mit dem Wert von S1 überprüft werden. Dazu wurde der Wert von S1 mit dem Wert aus der computergestützten Auswertung der *Per2*-Expression verglichen (Abbildung 29a). Eine Regressions-Analyse mit StatView zeigte, dass es keinen Zusammenhang gibt. Desgleichen wurde auch der Wert S2 dem Wert aus der computergestützten Auswertung gegenübergestellt (Abbildung 29b). Die Regressions-Analyse konnte wiederum keine Korrelation erfassen.

a)



b)

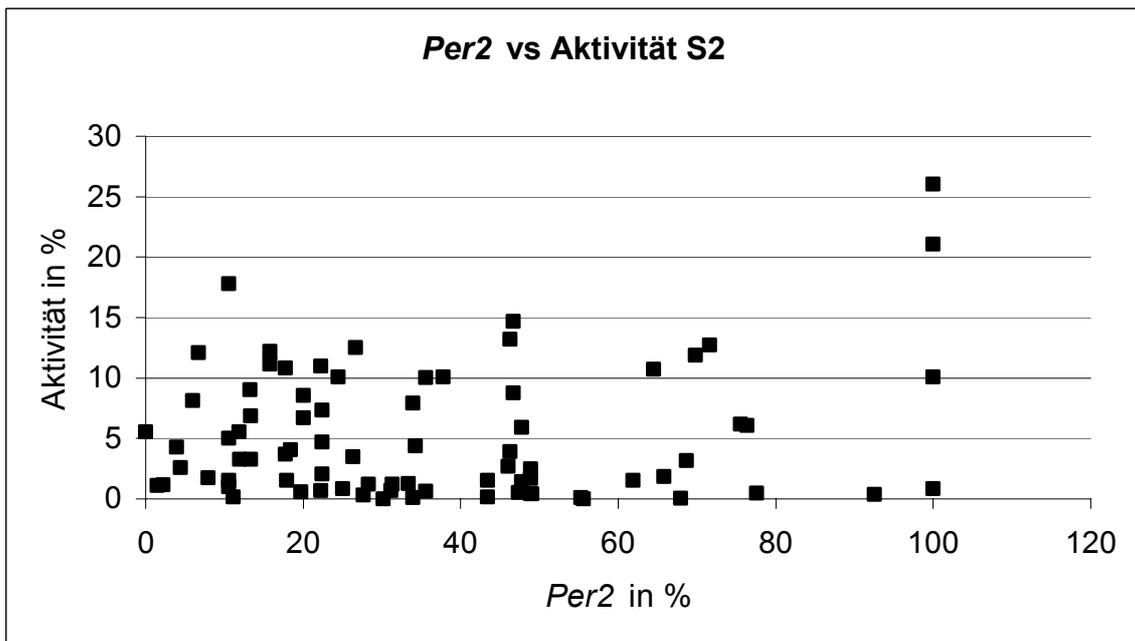


Abbildung 29:

Aktivität S1 (a) und S2 (b) in Abhängigkeit der *Per2*-Expression, wie sie die computergestützte Auswertung ergab. Die Aktivität ist in Prozent der täglichen Gesamtaktivität angegeben.

3.5.3 NPY vs. Aktivität

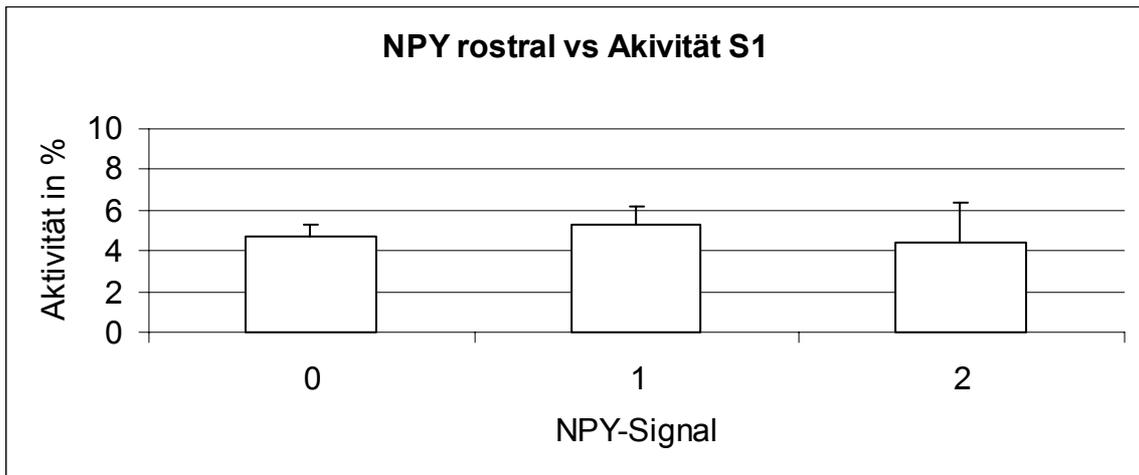
Um das Signal des Antikörpers gegen NPY mit der Aktivität zu vergleichen, wurden die Werte der Aktivität in Abhängigkeit von der Stufe der Signalausdehnung (0, 1 und 2) analysiert. Dies fand für den rostralen, den medialen und den caudalen Bereich getrennt statt (Abbildung 30 und 31).

Bei den Tieren ohne Signal (Stufe 0) im rostralen Bereich des SCN fanden $4,7 \pm 0,6$ % der Aktivität zu S1 statt. Dieser Wert unterschied sich nicht signifikant von denen der Stufe 1 ($5,3 \pm 0,9$ %) und Stufe 2 ($4,5 \pm 1,9$ %). Für den medialen Bereich des SCN ergaben sich für S1 Werte von $5,1 \pm 1,4$ % (Stufe 0), $4,9 \pm 0,8$ % (Stufe 1) und $4,7 \pm 0,7$ % (Stufe 2). Auch diese Werte zeigten keinen signifikanten Unterschied. Auch für den caudalen Bereich waren die Werte mit $4,7 \pm 0,6$ % (Stufe 0), $5,7 \pm 1,4$ % (Stufe 1) und $4,7 \pm 0,8$ % (Stufe 2) von ähnlicher Größe und unterschieden sich nicht signifikant (Abbildung 30).

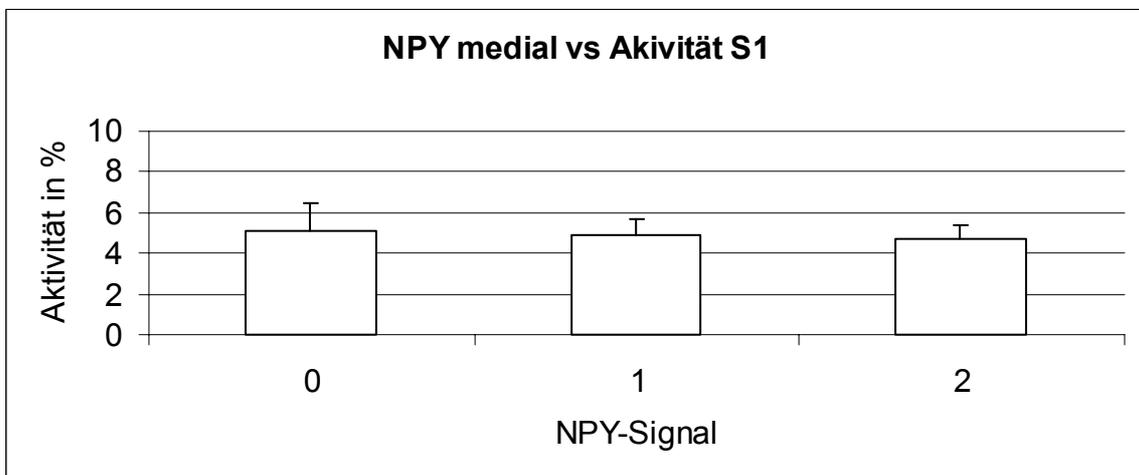
Die Werte von S2 waren für den rostralen Bereich $5,1 \pm 0,7$ % (Stufe 0), $5,2 \pm 1,4$ % (Stufe 1) und $6,3 \pm 2,1$ % (Stufe 2), für den medialen Bereich $5,8 \pm 1,6$ % (Stufe 0), $4,6 \pm 1,0$ % (Stufe 1) und $5,5 \pm 0,9$ % (Stufe 2) sowie für den caudalen Bereich $4,6 \pm 0,8$ % (Stufe 0), $4,5 \pm 1,5$ % (Stufe 1) und $6,2 \pm 1,1$ % (Stufe 2) (Abbildung 31).

In allen Bereichen des SCN konnte somit kein signifikant erhöhter oder verringerter Wert ermittelt werden.

a)



b)



c)

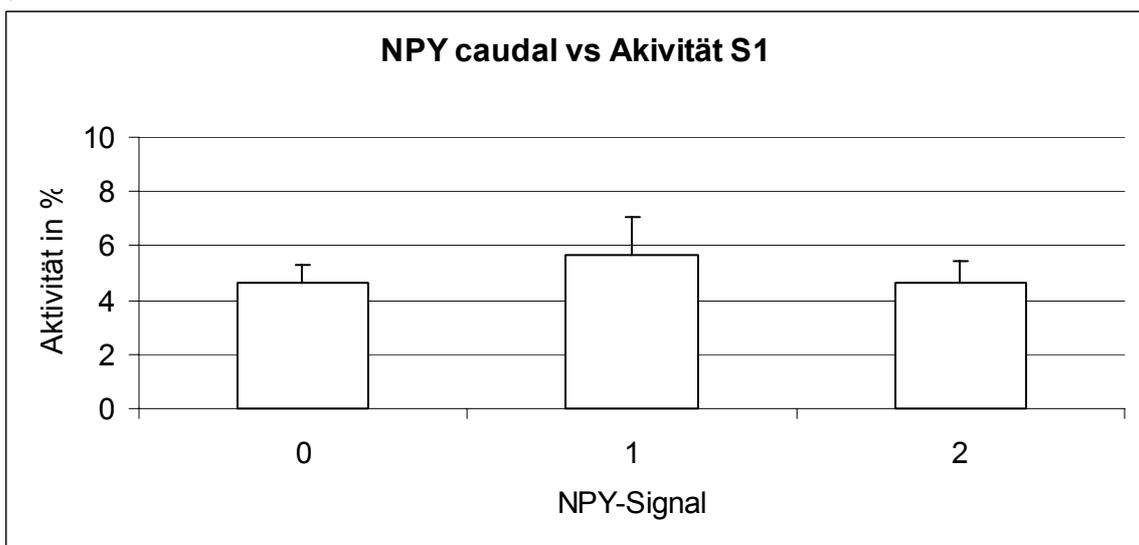
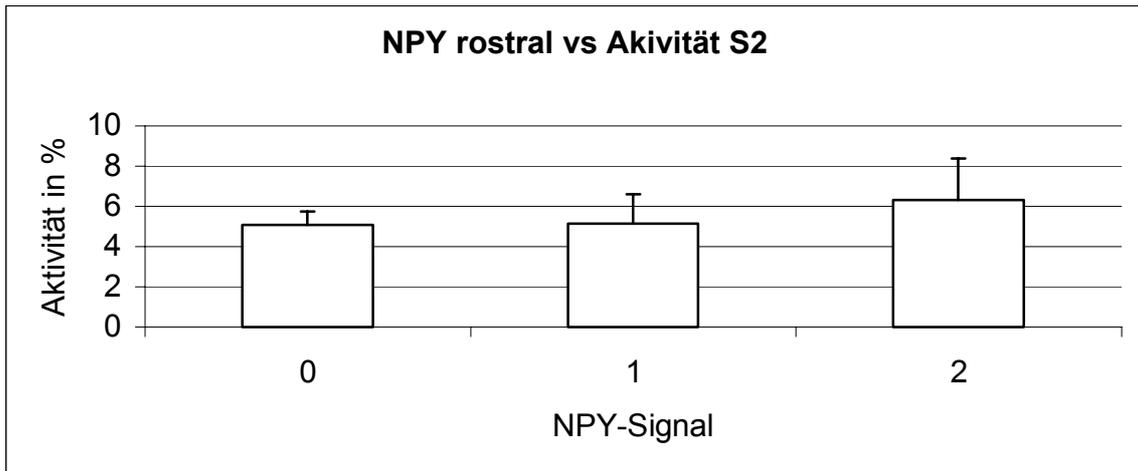
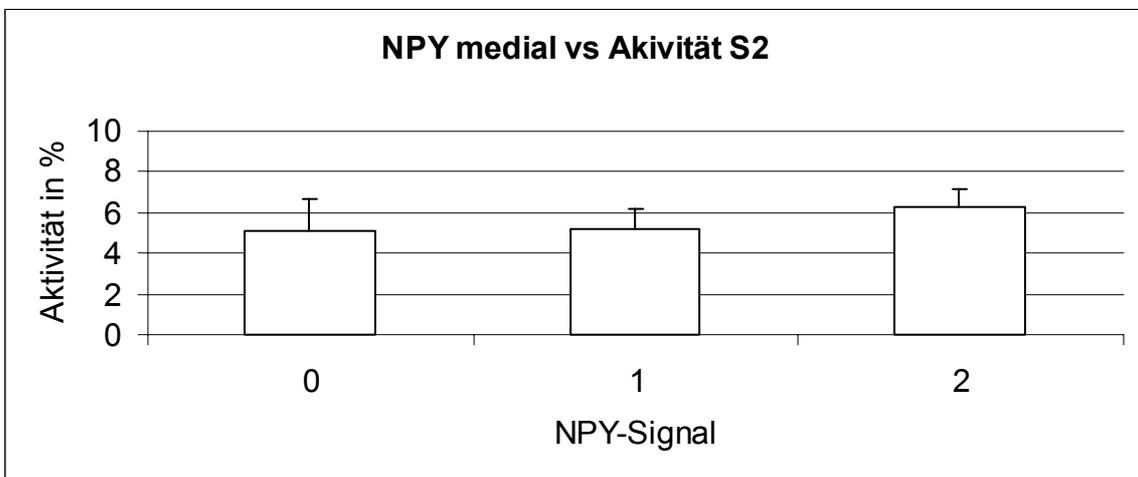


Abbildung 30:
Aktivität S1 für die verschiedenen Ausprägungen des Signals des Antikörpers gegen NPY. Die Aktivität ist als prozentualer Wert der täglichen Gesamtaktivität angegeben.

a)



b)



c)

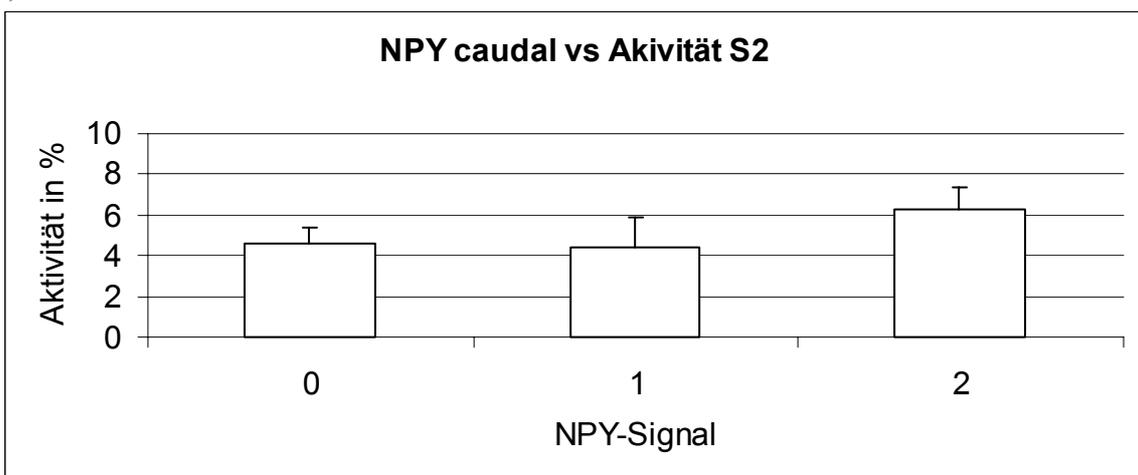


Abbildung 31:
Aktivität S2 für die verschiedenen Ausprägungen des Signals des Antikörpers gegen NPY. Die Aktivität ist als prozentualer Wert der täglichen Gesamtaktivität angegeben.

4 Diskussion

Das Tiermodell der lichtinduzierten Arrhythmie beim Dsungarischen Zwerghamster (*Phodopus sungorus*) ist bisher nur phänomenologisch charakterisiert (STEINLECHNER et al. 2002). Man weiß, dass nach zwei Lichtpulsen in aufeinander folgenden Dunkelphasen bei Dsungarischen Zwerghamstern Arrhythmie auftreten kann. Diese Arrhythmie bezieht sich nach den bisherigen Untersuchungen auf drei unterschiedliche, normalerweise stark ausgeprägte Rhythmen der Aktivität, der Körpertemperatur und der Melatonin-Ausschüttung. Daraus wird geschlossen, dass die Ursache der Arrhythmie im zentralen Mechanismus der inneren Uhr lokalisiert sein muss. Da bei älteren Tieren auch spontan Arrhythmie auftreten kann, werden für die lichtinduzierte Arrhythmie nur junge Tiere verwendet. Die vorliegende Arbeit soll die Charakterisierung der lichtinduzierten Arrhythmie weiterführen und ergänzen. Dabei wurde auf die Erstellung von arrhythmischen Tieren Wert gelegt und durch histologische Arbeiten die Positionierung des Tiermodells in die aktuellen Modellvorstellungen zur circadianen Rhythmik ermöglicht.

Zur Charakterisierung des Tiermodells wurde nach Unterschieden zwischen den Tieren, die rhythmisch bleiben und denen, die lichtinduziert arrhythmisch werden, gesucht. Hierbei gab es drei Faktoren die näher betrachtet wurden: die Möglichkeit eines genetischen Hintergrunds durch Verwendung von vier Zuchtlinien, die Aktivität in den Tagen vor den Lichtpulsen und die Entwicklung der Aktivität nach den Lichtpulsen.

Verständnis für die Vorgänge im circadianen System bei den arrhythmischen Tieren sollte zum Einen die Betrachtung der Expression von *Per1* und *Per2*, zum Anderen die Untersuchung des immunhistologischen Signals gegen NPY bringen. *Per1* und *Per2* sind in einer diskutierten Hypothese je ein essentieller Baustein eines M-(morning)- und eines E-(evening)-Oszillators des molekularen circadianen Systems (DAAN et al. 2001). Werden diese Komponenten erfasst, kann die Funktionalität des gesamten molekularen Systems überprüft werden. NPY ist hingegen ein Neuropeptid, das bei der Innervierung des SCN eine große Rolle spielt: Es steht im engen Zusammenhang mit der Beeinflussung der circadianen Rhythmik durch Aktivität. Da der Einsatz von Laufrädern die arrhythmischen Hamster wieder rhythmisch werden lässt (STEINLECHNER et al. 2002), verspricht die Betrachtung des immunhistochemischen Signals gegen NPY weiteren Aufschluss über die Vorgänge im circadianen System der arrhythmischen Tiere zu geben.

4.1 Material und Methoden

Die geringe Ausbeute des Modells machte es nötig, die Aktivität vieler Tiere zu registrieren (vergleiche 4.2). Um mehr Tiere als bisher parallel überwachen zu können, wurde eine Umstrukturierung der Anlage zur Aktivitätsmessung nötig. In dem verwendeten Tierraum konnte so anstatt von 16 Tieren letztlich die Aktivität von 65 Tieren gleichzeitig aufgenommen werden. Da die Bewegungsmelder eine unterschiedliche Empfindlichkeit aufwiesen, wurde ein Programm verwendet, das durch eine Restriktionszeit die Unterschiede minimiert.

Die Ausbeute an lichtinduziert arrhythmischen Tieren war in dieser Arbeit geringer als in der Literatur beschrieben (siehe 4.2). Als methodische Fehler kommen zusätzliche Störungen der Tiere genauso wie das Fehlen der Lichtpulse in Frage. Um diese Möglichkeiten auszuschließen, wurde das Lichtregime mittels Fototransistor überwacht. Dies zeigte, dass das Lichtregime den Erwartungen entsprach, d. h. neben dem täglichen Hell-Dunkel- und Dunkel-Hell-Wechsel gab es genau die zwei für das Modell nötigen Lichtpulse. Zudem zeigten stets die Aktogramme zumindest einzelner Tiere eine Reaktion auf die Lichtpulse. Nicht-photische Störungen durch den Einfluss anderer Menschen konnten durch Abschließen des Raums und seiner Überwachung mittels eines Bewegungsmelders ausgeschlossen werden.

Der geringe Anteil an arrhythmischen Tieren nach der Gabe von Lichtpulsen, führte dazu, dass die Planung mancher Versuchsdurchgänge nicht mit dem vorgesehenen Verhältnis an rhythmischen und arrhythmischen Tieren durchgeführt werden konnte. In diesem Fall wurden anstelle der fehlenden arrhythmischen Tiere weitere rhythmische Tiere in die histologische Aufarbeitung einbezogen, um die Kapazitäten auszunutzen. Dieses Vorgehen begründet die inhomogenen Tierzahlen, die in der Statistik berücksichtigt wurden.

Methodisch ungünstig war die Lage der Tierräume zu dem Labor, in dem die Tötungen stattfanden. Während sich die Tierräume im Erdgeschoss befanden, lag der Abzug, unter dem die Perfusionen vorgenommen werden mussten, im sechsten Stock des Gebäudes. Dies hatte zur Folge, dass die Tiere vor ihrer Tötung transportiert werden mussten. Für die Zukunft wäre es empfehlenswert, zumindest eine Anlage zur Aktivitäts-Registrierung der letzten Stunden auch in der Nähe des Labors zu installieren, in dem es zur Tötung kommt.

Die histologischen Arbeiten basierten weitgehend auf etablierten Protokollen. Lediglich die Schnittdicke wurde variiert: Um eine Serie mehr zu erhalten, wurde sie von

25 auf 20 µm reduziert. Da die dünneren Schnitte beim Aufziehen häufiger beschädigt wurden, war die Orientierung im histologischen Präparat grundsätzlich erschwert. Zudem ist dieses Verfahren für Untersuchungen, die über einen eng umrissenen Bereich wie den SCN (*Nucleus suprachiasmaticus*) hinausgehen, nicht empfehlenswert. Das immunhistologische Protokoll war bereits etabliert und es gab keinen Anlass zur Modifikation. Die *in situ*-Hybridisierung fand zuvor immer an Parafinschnitten statt. Da zur Verwendung von Parallelschnitten bei der *in situ*-Hybridisierung und der Immunhistologie sowieso in einem Bereich umgestellt werden musste und sich das Gehirn des Dsungarischen Zwerghamsters - wie Vorversuche zeigten - nicht für Parafinschnitte nach dem für Mäuse-Gehirne verwendeten Protokoll eignete, wurde die *in situ*-Hybridisierung auch an Gefrierschnitten durchgeführt. Dabei traten keine Probleme auf.

4.2 Ausbeute an lichtinduziert arrhythmischen Tieren

Von STEINLECHNER et al. (2002) wird beschrieben, dass 75% der Tiere, die man zwei Lichtpulsen ausgesetzt, arrhythmisch wurden. Dieses Ergebnis liegt deutlich über dem Anteil arrhythmischer Tiere, die Ruby et al. (1996) durch Phasenverschiebung erreichen konnten. Hierbei wurde insgesamt ein Drittel der Tiere arrhythmisch. Allerdings wurden lediglich 10% der eingesetzten Tiere sofort arrhythmisch, während die anderen arrhythmischen Tiere zunächst wie insgesamt 80% der Tiere Freilauf zeigten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit reagierten 11,7% der Tiere auf die Lichtpulse mit Arrhythmie. Diese im Vergleich zur Literatur geringe Ausbeute ist nicht durch Fehler im Versuchsaufbau entstanden (vergleiche 4.1).

Gerade die deutlich verringerte Ausbeute lässt es besonders interessant erscheinen, nach Merkmalen zu suchen, die eine vorangehende Auswahl der Tiere, die wahrscheinlich arrhythmisch werden, ermöglichen. Andere Untersuchungen gaben dabei den Anstoß zur Vorgehensweise: Bei „Kurztag-Non-Respondern“ (Tiere, die bei verkürzter Lichtperiode nicht zu „Wintertieren“ werden) konnte durch Auswertung von Aktogrammen gezeigt werden, dass Tiere, die ihre Aktivität nicht an die längere Dunkelphase anpassen, auch später nicht die für den Kurztag üblichen physiologischen Veränderungen aufweisen (PUCHALSKI und LYNCH 1988).

Der Vergleich der Aktivität in den Tagen vor den Lichtpulsen erbrachte allerdings keinen Hinweis darauf, welche Tiere arrhythmisch werden würden. Die Gesamtaktivität konnte dabei als Merkmal genauso ausgeschlossen werden wie die Aktivität zu jenen

Zeitpunkten, zu denen später die Lichtpulse gegeben wurden. Aber auch bei den „Kurztag-Non-Respondern“ konnte erst nach der Veränderung der Bedingungen (Kurztag) der Unterschied gesehen werden. Genauso wäre es für das Modell der lichtinduzierten Arrhythmie von Vorteil, in den ersten Tagen nach den Lichtpulsen zu wissen, ob sich eine dauerhafte Arrhythmie entwickeln kann. Eine Betrachtung der Veränderungen in den Aktogrammen nach den Lichtpulsen zeigt, dass es drei Aktogrammtypen gibt, die eine anschließende Arrhythmie weitestgehend ausschließen:

Wird durch die Lichtpulse nur ein Aktivitätsstop als akute Reaktion ausgelöst, ohne dass man an den folgenden Tagen eine Veränderung erkennen kann (Aktogrammtyp 0), ist eine anschließende Arrhythmie genauso unwahrscheinlich wie in dem Fall, dass eine einseitige α -Kompression ohne Änderung des Aktivitätsbeginns vorliegt (Aktogrammtyp 1), oder es zu einer nicht fortschreitenden beidseitigen α -Kompression kommt (Aktogrammtyp 2).

Somit gibt es die Möglichkeit, die erwartete Ausbeute gegebenenfalls schon frühzeitig zu korrigieren.

LYNCH et al. (1989) konnten durch den Vergleich von Zuchtlinien aus Deutschland und den USA für die „Kurztag-Non-Responder“ zudem zeigen, dass es einen genetischen Hintergrund für das Merkmal „Kurztag-Non-Responder“ gibt. Ob es für die lichtinduzierte Arrhythmie ebenfalls einen genetischen Hintergrund gibt, wurde in dieser Arbeit durch den Vergleich von drei bestehenden Zuchtlinien (ZL1 bis ZL3) und der Einführung einer Inzuchtlinie (ZL4) untersucht. Die Zuchtlinie ZL1 beruht auf Wildfängen von 1998. Nachkommen dieser Tiere wurden bereits von STEINLECHNER et al. (2002) verwendet. Sie erwähnten, dass wenige dieser Tiere auf die Lichtpulse reagieren. Dies konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Den Tieren aus vorangegangenen Arbeiten müsste die Zuchtlinie ZL2 am Nächsten kommen, da sie auf Dsungarischen Zwerghamstern der seit Jahren etablierten Zuchtlinie aus Marburg aufbaut. Für ZL2 ist der Anteil an arrhythmischen Tieren mit 22% deutlich höher als in den anderen Zuchtlinien. Der Vergleich mit der von STEINLECHNER et al. (2002) erreichten Ausbeute von 75% zeigt jedoch einen deutlichen Unterschied. Auch bei dem ähnlichen Modell von RUBY et al. (1996) war die Ausbeute 50% höher. Wie es zu diesen Unterschieden kommt, ist an dieser Stelle nicht zu klären. Allerdings liegt die Vermutung einer Gendrift nahe, denn der gezeigte Unterschied zwischen ZL1 und ZL2 ist ein deutlicher Hinweis auf einen genetischen Hintergrund für dieses Merkmal.

ZL3 ist eine Zuchtlinie, die auf Tieren der oben schon erwähnten Zucht aus Marburg basiert, in die aber im Jahr 1999 Tiere aus ZL1 eingekreuzt wurden. Die Ausbeute lag mit 9% intermediär zwischen den Werten von ZL1 und ZL2. Somit wird die Vermutung eines genetischen Hintergrunds für die lichtinduzierte Arrhythmie, die durch den Unterschied zwischen ZL1 und ZL2 bereits gegeben war, bestätigt.

Der Versuch, durch Inzucht (ZL4) das Merkmal der lichtinduzierten Arrhythmie zu isolieren, ist fehlgeschlagen. Die Ausbeute stimmte mit 10% mit der Ausbeute der Ausgangsgruppe (ZL3) überein. Dies lag wahrscheinlich daran, dass die Inzucht im Zeitraum dieser Arbeit nicht über genügend Generationen erfolgen konnte. Die Verpaarung von Geschwistern direkt nach dem Absetzen von der Mutter blieb zudem häufig erfolglos. Auch Verpaarungen von lichtinduziert arrhythmischen Tieren brachten keine Nachkommen. Ein neuer Ansatz wäre, den Zuchtpaaren Käfige mit Laufrad zur Verfügung zu stellen, um die Arrhythmie sicher wieder aufzuheben.

Durch die Betrachtung der verschiedenen Zuchtlinien, in denen das Merkmal über mehrere Generationen in unterschiedlichem Ausmaß auftrat, konnte gezeigt werden, dass ein genetischer Hintergrund vorhanden ist. Für die Zukunft erscheint es sinnvoll zu versuchen, das Merkmal in einer Zuchtlinie zu isolieren.

4.3 *Per1*-Expression

Die *Per1*-Expression ist in der Maus einem Tagesgang unterworfen, dessen Maximum in der Hellphase liegt (SUN et al. 1997, TEI et al. 1996). Beim Dsungarischen Zwerghamster konnte mit immunhistologischen Methoden gezeigt werden, dass das Protein PER1 im Langtag (Licht/Dunkel 16/8) über einen längeren Zeitraum in den Zellen vorhanden ist als im Kurztag (Licht/Dunkel 8/16) (NUESSLEIN-HILDESHEIM et al. 2000). Dies gibt Anlass zu der Annahme, dass *Per1* ein variables Element der circadianen Rhythmik des Dsungarischen Zwerghamsters ist. Versuche mit Knock-Out-Mäusen unter verschiedenen Lichtbedingungen (ALBRECHT et al. 2001, STEINLECHNER et al. 2002) unterstützen zudem das M-E-Modell nach DAAN et al. (2001), wonach *Per1* ein Element des M-Oszillators ist. Der Nachweis der *Per1*-Expression bei rhythmischen und arrhythmischen Tieren in dieser Arbeit soll zeigen, ob die Vermutung bestätigt werden kann, dass in arrhythmischen Tieren der M-Oszillator nicht mehr mit dem Lichtregime synchronisiert ist. Neben der Hypothese, dass M- und E-Oszillator nicht mehr gekoppelt sind, gibt es jene, dass die Synchronisation der Zellen des SCN miteinander aufgehoben ist. In diesem Fall wäre zu allen Zeitpunkten eine ähnliche, diffus über den SCN verteilte

Expression zu erwarten. Auch die Trennung der Synchronisation des rechten und linken SCN könnte möglich sein, wobei dies für das Phänomen des „Splitting“ beschrieben wurde (DE LA IGLESIA et al. 2000).

Die *Per1*-Expression wurde bei rhythmischen und arrhythmischen Tieren untersucht. Bei den rhythmischen Tieren konnte der oben beschriebene aus der Literatur bekannte Tagesgang mit einem Minimum in der Nacht nachvollzogen werden. Bei den arrhythmischen Tieren war kein Tagesgang mehr zu erfassen. Es gab aber bei den arrhythmischen Tieren das gleiche Spektrum an Werten für die Expression. Dies widerspricht der Erwartung für die Hypothese, dass die einzelnen Zellen des SCN von einander entkoppelt sind. Für diesen Fall wäre eine mittlere Expression bei allen Tieren zu erwarten. Wegen der Vielzahl der Zellen im SCN müsste nämlich immer eine etwa gleiche Anzahl an Zellen gerade eine erhöhte *Per1*-Expression aufweisen.

Die Desynchronisation des linken und rechten SCN konnte ausgeschlossen werden, denn das Signal in beiden SCN war immer gleich ausgeprägt. Da beim „Splitting“ gezeigt wurde, dass ein Auseinanderlaufen der Rhythmen des rechten und linken SCN (DE LA IGLESIA et al. 2000) zu zwei Aktivitätsphasen führt, wäre das Entkoppeln des rechten und linken SCN nur bei Aktivitätsphasen von je 12 Stunden eine vollständige Erklärung für die lichtinduzierte Arrhythmie.

Wie oben erwähnt weisen die arrhythmischen Tiere das gleiche Spektrum an Werten für die Expression auf, wie es die rhythmischen Tiere zeigen. Dies ist ein Hinweis auf einen Freilauf der *Per1*-Expression bei jedem Individuum: Die Werte der rhythmischen Tiere ergeben nur deswegen einen Tagesgang, weil die Synchronisation der Tiere mit dem Lichtregime bewirkt, dass sich die Werte der Expression einem Zeitpunkt zuordnen lassen. Ein Freilauf der Expression alleine ist jedoch keine Erklärung für Arrhythmie, da er normalerweise lediglich einen Freilauf der circadianen Rhythmik zur Folge hätte. Wie dieses Ergebnis hilft, die Arrhythmie zu erklären, wird in den Schlussfolgerungen (4.7) erläutert.

4.4 *Per2*-Expression

Wie für die *Per1*-Expression ist auch für *Per2*-Expression ein Tagesgang nachgewiesen worden (ALBRECHT et al. 1997, SHERMAN et al. 1997, TAKUMI et al. 1998). Er ist zum Tagesgang von *Per1* zeitlich etwas versetzt. Der *Per2* Tagesgang scheint dem von *Per1* zu folgen. Entsprechend diesem mRNA-Nachweis liegen auch beim Nachweis des Proteins das Maximum und das Minimum zeitlich etwas versetzt zu den Werten von

PER1 (NUESSLEIN-HILDESHEIM et al. 2000). Zudem wurde wie für PER1 eine von der Tageslänge abhängige Variabilität für die zeitliche Ausdehnung des Maximums beschrieben (NUESSLEIN-HILDESHEIM et al. 2000). Im M-E-Modell wird *Per2* dem E-(evening)-Oszillator zugeordnet. Dies wird durch Versuche mit Knock-Out-Mäusen (ALBRECHT et al. 2001, STEINLECHNER et al. 2002) unterstützt. Nachdem in dieser Arbeit durch die Untersuchung der *Per1*-Expression gezeigt werden konnte, dass es bei lichtinduziert arrhythmischen Tieren zu keiner Synchronisation des M-Oszillators mit dem Lichtregime kommt, sollte durch die Untersuchung der *Per2*-Expression die Funktion des E-Oszillators überprüft werden.

Der Nachweis der *Per2*-Expression bei rhythmischen Tieren erbrachte den erwarteten Tagesgang. Die Phasenverschiebung zwischen *Per1*- und *Per2*-Expression ließ sich durch die auch noch zu ZT 0 herunterregulierte *Per2*-Expression zeigen. Bei den arrhythmischen Tieren war kein Tagesgang zu erkennen. Sie hatten jedoch die gleichen Ausprägungen des Signals wie man sie von den rhythmischen Tieren kannte, so dass auch hier ein Freilauf der Expression zu vermuten ist. In einem Fall war die *Per2*-Expression nur im linken SCN nachweisbar. Da es sich hierbei um einen Einzelfall handelt, ist nicht anzunehmen, dass für das Modell eine Desynchronisation des rechten und linken SCN nötig wäre, doch zeigt es, dass sie möglich ist.

Die Tatsache, dass die *Per2*-Expression ebenso wie die *Per1*-Expression nicht mehr mit dem Licht-Dunkel-Wechsel synchronisiert, ist noch keine Erklärung für die Arrhythmie, da dies nur zu einem Freilauf führen dürfte. Für den Dsungarischen Zwerghamster fehlen leider die Methoden, die Kopplung zwischen M- und E-Oszillator zu erfassen. Ein Freilauf der Tiere, der nur auf Grund eines Masking-Effekts durch das Licht unerkant bleibt, ist jedoch von STEINLECHNER et al. (2002) experimentell ausgeschlossen worden, so dass die Entkopplung von M- und E-Oszillator an dieser Stelle am wahrscheinlichsten ist. Diese bereits von STEINLECHNER et al. geäußerte Vermutung wird durch diese Arbeit unterstützt.

4.5 NPY

Das Neuropeptid Y (NPY) wird vom IGL (*intergeniculate leaflet*) des LGN (*Corpus geniculatum laterale*) über den GHT (*Tractus geniculohypothalamicus*) in den SCN (*Nucleus suprachiasmaticus*) ausgeschüttet (SWANSON et al. 1974). Dieses Signal vermittelt dem circadianen System Informationen über den Aktivitätsstatus (BIELLO et al. 1994) und über das Lichtregime (JOHNSON et al. 1989; HARRINGTON 1997;

EDELSTEIN und AMIR 1999b). Für die Synchronisation mit einem Hell-Dunkel-Wechsel ist die direkte Verbindung des RHT (*Tractus retinohypothalamicus*) mit dem SCN verantwortlich, doch bei einer Skeleton-Photoperiode ist zudem das Signal des IGL zur Synchronisation nötig (EDELSTEIN und AMIR 1999b).

Da sich die lichtinduzierte Arrhythmie durch Aktivität im Laufrad aufheben lässt, scheint das Signal des IGL für dieses Tiermodell von besonderer Bedeutung zu sein. Zur Beurteilung der Einwirkung des IGL wurde das immunhistologische Signal gegen NPY betrachtet. Bei ähnlichen Untersuchungen an Ratten konnte im Standard-Lichtregime (LD 12:12) ein Tagesgang für NPY gefunden werden (CALZA et al. 1990; SHINOHARA et al. 1993a und 1993b). Dabei gab es zwei Maxima zu den Zeitpunkten des Hell-Dunkel- bzw. Dunkel-Hell-Wechsels.

In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob für das immunhistologische Signal gegen NPY in rhythmischen Dsungarischen Zwerghamstern ein ähnlicher Tagesgang wie bei den Ratten erfasst werden kann und ob sich das Signal bei den arrhythmischen und rhythmischen Tieren unterscheidet. Dazu wurde das Signal in seiner Ausdehnung betrachtet, da es methodisch nicht möglich war, seine Stärke zu unterscheiden (vergleiche 2.10).

Zwischen den einzelnen Tieren (ohne Unterscheidung von rhythmisch und arrhythmisch) gab es Unterschiede in der Ausdehnung des Signals. Dies zeigt, dass auch beim Dsungarischen Zwerghamster eine Modulation des Signals möglich ist. Allerdings konnte bei den rhythmischen Tieren kein Tagesgang erfasst werden, was nicht zwangsläufig heißen muss, dass keiner vorhanden ist. Auch in anderen Arbeiten streuten die Werte recht stark (CALZA et al. 1990). Die Unterscheidung in einen rostralen, einen medialen und einen caudalen Bereich des SCN brachte ebenfalls keine weitere Erkenntnis. Wahrscheinlich ist der akute Status der Bewegung beim Dsungarischen Zwerghamster ein bedeutender Faktor für das Signal, so dass eine Standardisierung oder zumindest eine Erfassung der Aktivität vor der Tötung hilfreich wäre. Der Vergleich zwischen den rhythmischen und arrhythmischen Tieren zeigte keinen erkennbaren Unterschied. Auch bei den arrhythmischen Tieren gab es alle von den rhythmischen Tieren bekannte Formen der Ausdehnung des Signals. Hieraus wird ersichtlich, dass die lichtinduzierte Arrhythmie die Funktion des IGL nicht stört. Wahrscheinlich bewirkt erst eine langanhaltende intensive Aktivität wie die Laufrad-Nutzung eine NPY-Ausschüttung, die so deutlich ist, dass sie als Zeitgeber die Komponenten der circadianen Rhythmik wieder synchronisieren kann.

4.6 Vergleich der Aktivität mit der Histologie

In den letzten fünf Tagen vor der späteren Tötung wurde die Aktivität der Tiere zum geplanten Tötungszeitpunkt mit der *Per1*- und *Per2*-Expression sowie dem immunhistochemischen Signal gegen NPY verglichen. Diese Vergleiche zeigten, dass es keinerlei Korrelation zwischen der registrierten Aktivität und den erfassten histologischen Signalen gab.

Die Vermutung, dass der Expressions-Rhythmus von *Per1* und *Per2* bei arrhythmischen Tieren jeweils freilaufend ist, legt nahe, dass eine Zuordnung der Aktivität eines durch den Zeitgeber definierten Zeitraums zu den histologischen Ergebnissen nicht möglich ist. Nur ein Vergleich der Aktivität vor der Tötung könnte eventuell über einen Zusammenhang Aufschluss geben. Die Erfassung der Aktivität vor der Tötung war durch räumliche Vorgaben nicht möglich (siehe 4.1). Somit konnte dieser Vergleich in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt werden. Gerade bei dem immunhistologischen Signal gegen NPY liegt die Vermutung nahe, dass die aktuelle Aktivität den größten Ausschlag für das erfasste Signal gibt, denn NPY vermittelt dem SCN die Information über die Aktivität. Daher lässt sich die starke Streuung der Werte eventuell durch den Transport der Tiere vor der Tötung erklären. Die Reaktion der Tiere war dabei sehr unterschiedlich: Einige Tiere reagierten scheinbar gar nicht auf diese Veränderung, andere waren längere Zeit aktiv. Da die Bedeutung vorher nicht erkannt wurde, sind diese Unterschiede nicht protokolliert worden. Wenn keine automatische Aktivitätsregistrierung möglich ist, sollte in Zukunft zumindest eine subjektive Beurteilung des Aktivitätsstatus festgehalten werden.

4.7 Schlussfolgerungen

Der Dsungarische Zwerghamster muss sich an extreme Klimaschwankungen anpassen. Dies geschieht über die Interpretation der Tageslänge(nänderung) als Zeichen für die Jahreszeit. Es ist ein auf den ersten Blick erstaunliches Phänomen, dass es ausgerechnet bei einer solchen Tierart unter Laborbedingungen leicht gelingt, ihren circadianen Rhythmus aufzulösen (RUBY et al. 1996; STEINLECHNER et al. 2002).

Die Vermutung, ein Entkoppeln des M- und des E-Oszillators sei hierfür verantwortlich (STEINLECHNER et al. 2002), gibt einen ersten Hinweis auf den Hintergrund für diese „Schwäche“ der Dsungarischen Zwerghamster. In dieser Arbeit konnte die Entkopplung des M- und des E-Oszillators zwar nicht bewiesen werden,

jedoch unterstützt die Tatsache, dass die nach DAAN et al. (2001) entscheidenden Elemente dieser Oszillatoren *Per1* und *Per2* nicht mehr mit dem Zeitgeber Licht synchronisiert sind, diese Vermutung.

Normalerweise sind M- und E-Oszillatoren aneinander gekoppelt, doch müssten die Tiere dann einen Freilauf zeigen und dürften nicht arrhythmisch werden. Die Vermutung, dass diese Kopplung bei lichtinduzierter Arrhythmie aufgehoben wird, ist die Hypothese, welche die vorliegende Arbeit vertritt.

Für die in dieser Arbeit untersuchten Elemente des circadianen Systems *Per1* und *Per2* haben NUSSLEIN-HILDESHEIM et al. (2000) gezeigt, dass die Veränderung der Tageslänge eine Auswirkung auf die Expressionsmuster hat. Somit ist eine lediglich leichte Kopplung zwischen M- und E-Oszillator wahrscheinlich nötig, um eine gute Anpassung an verschiedene Tageslängen zu gewährleisten. Dies zeigt, dass die hier für die lichtinduzierte Arrhythmie postulierte schwache Kopplung zwischen M- und E-Oszillator kein Widerspruch zur großen Bedeutung der circadianen Rhythmik für diese Tiere ist. Hinzu kommt, dass die Kopplung zwischen M- und E-Oszillator nur unter künstlichen Bedingungen so schwach ist, dass es zur Entkopplung kommen kann. Schon ein Laufrad, das es den Tieren ermöglicht, ihrem natürlichen Bewegungsdrang gerecht zu werden, reicht aus, um die Entkopplung aufzuheben (STEINLECHNER et al. 2002).

4.8 Ausblick

Die circadiane Rhythmik ist für alle Lebewesen von großer Bedeutung. Bei vielen Säugetieren spielt sie zudem eine zentrale Rolle bei der Anpassung an die Jahreszeiten. Zu diesen Tieren gehört der Dsungarische Zwerghamster. Das Modell der lichtinduzierten Arrhythmie bei dieser Tierart kann sicherlich noch mehr Aufschluss über die Komponenten der circadianen Rhythmik geben. Dazu sollte versucht werden, eine Zuchtlinie zu etablieren, die eine hohe Ausbeute an lichtinduziert arrhythmischen Tieren hervorbringt. Dies sollte durch die Verpaarung nichtverwandter lichtinduziert arrhythmischer Tiere nach Wiederherstellung ihrer Rhythmik durch Laufräder möglich sein.

Da in dieser Arbeit zwischen arrhythmischen und rhythmischen Tieren kein Unterschied in der NPY-Ausschüttung erfasst werden konnte, ist die Untersuchung der NPY-Ausschüttung im SCN von arrhythmischen Tieren, nachdem diese Zugang zu einem Laufrad hatten, ein zukünftiges Ziel. Dadurch sollte geklärt werden, auf welche Weise die Wiederherstellung der Rhythmik bewirkt wird. Im Zusammenhang mit einem solchen

Versuch sollte auch geklärt werden, ob bei rhythmischen Tieren durch ein Laufrad ein Tagesgang in der Ausprägung des immunhistochemischen Signals gegen NPY erzeugt werden kann.

Für die *Per1*- und *Per2*-Expression wurde im Fall der lichtinduzierten Arrhythmie eine Entkopplung vom Lichtregime gezeigt. Es fehlte dabei die Möglichkeit, mehrere Zeitpunkte von einem Tier zu untersuchen. Elektrophysiologische Methoden bieten sich an, um die Rhythmik des SCN zu erfassen. Bei der Vermutung, dass *Per1* und *Per2* bei lichtinduziert arrhythmischen Tieren voneinander entkoppelt sind, ist für die Ableitungen von SCN-Zellen dieser Tiere keine circadiane Rhythmik zu erwarten.

Ein weiterer Ansatz ist die Gabe von antisense Oligonucleotiden von *Per1* oder *Per2* in den dritten Ventrikel, denn die Unterdrückung eines Oszillators müsste es dem anderen Oszillator wie in Knock-Out-Mäusen ermöglichen, seine Periode als circadianen Rhythmus für das ganze Tier zu zeigen.

5 Zusammenfassung

Der Dsungarische Zwerghamster (*Phodopus sungorus*) ist ein kleines Nagetier, das zur Adaption an seinen sibirischen Lebensraum eine ausgeprägte Anpassung an die Jahreszeiten zeigt. Sie wird durch Komponenten des circadianen Systems gesteuert: Die Veränderung der Tageslänge wird als Zeichen der jahreszeitlichen Veränderung wahrgenommen. Auf molekularer Ebene lässt sich dies durch eine Veränderung im Expressionsmuster der Uhrgene *Per1* und *Per2* im SCN (*Nucleus suprachiasmaticus*) sehen: Bei verkürzter Hellphase ist die Dauer der erhöhten Expression deutlich kürzer und ihre Phasenlage zueinander verschiebt sich.

Unter Laborbedingungen lässt sich die circadiane Rhythmik eines Teils der Dsungarischen Zwerghamster durch die Gabe zweier Lichtpulse in aufeinander folgenden Nächten aufheben. Dies geschieht sogar, wenn der für Säugetiere wichtigste Zeitgeber, der Licht-Dunkel-Wechsel noch vorhanden ist. Diese Arrhythmie ist reversibel und lässt sich durch die Bereitstellung eines Laufrads aufheben. In dieser Arbeit konnte durch den Vergleich verschiedener Zuchtlinien gezeigt werden, dass es für die lichtinduzierte Arrhythmie einen genetischen Hintergrund geben muss.

Da postuliert wird, dass *Per1* und *Per2* als Komponenten des M-(morning)-, bzw. des E-(evening)-Oszillators die zwei Hauptkomponenten der circadianen Rhythmik beeinflussen, ist ihr Expressionsmuster von großer Aussagekraft für die molekularen Vorgänge der circadianen Rhythmik. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression der beiden untersuchten Uhrgene bei arrhythmischen Tieren nicht wie bei rhythmischen Tieren mit dem Hell-Dunkel-Wechsel synchronisiert ist. Es traten aber alle Stufen der Expression auf, so dass ein Freilauf zu vermuten ist. Da ein gekoppelter Freilauf beider Gene zu einem Freilauf des Tieres führen müsste, ist die resultierende Annahme, dass der M- sowie der E-Oszillator entkoppelt sind und gegenseitig die durch sie vermittelten Aktivitätsphasen unterdrücken. Warum sie sich nicht durch Licht, wohl aber durch Aktivität wieder synchronisieren lassen, sollte durch die Untersuchung des im SCN freigesetzten Neuropeptid Y (NPY) festgestellt werden.

Weder für die rhythmischen noch für die arrhythmischen Tiere konnte ein Tagesgang im immunhistologischen Signal gegen NPY festgestellt werden. Dies lag nicht an einem immer gleich hohen Signal, sondern an einer hohen Streuung der Werte zu allen Zeitpunkten. Die Bedeutung der NPY-Ausschüttung im SCN für dieses Modell wird erst durch Erfassen des immunhistologischen Signals gegen NPY bei Tieren mit Laufrad geklärt werden können.

6 Summary

The Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*) is a small rodent, which shows a strong adaptation to seasonal influences in response to its Siberian habitat. This adaptation is controlled by the circadian system and changes in daytime length are used as environmental signals for seasonal changes. This can be seen in a change of expression patterns of the clock genes *Per1* and *Per2* in the SCN, i.e. a shorter daytime decreases the duration of high *Per1* and *Per2* expression and changes their phase-relationship.

Under controlled conditions circadian rhythms can be abolished in a subpopulation of Djungarian hamsters using two light pulses in consecutive nights. This arrhythmia is shown despite the presence of a strong Zeitgeber, the light-dark cycle. In contrast, arrhythmic animals obtain a normal rhythm again when they are allowed access to a running wheel. In the present study it could be shown from the comparison of different strains of Djungarian hamsters that there exists a genetic background for the light pulse induced arrhythmia.

Per1 and *Per2* are considered as parts of the M-(morning)- and E-(evening)-oscillator, respectively, therefore the expression patterns of these two genes are of great importance for the molecular mechanism of circadian rhythm. It was possible to show that the expression of both clock genes is not synchronized with the light-dark cycle in arrhythmic animals. Interestingly, all steps of expression could be detected in these animals suggesting free-running of the gene expression. If the free-running of *Per1* and *Per2* would be coupled to each other the animal had to show free-running activity. Therefore the working hypothesis is that the M- and E-oscillators are uncoupled and depress each other's output.

Furthermore, the investigation focused on a possible role of NPY in the SCN, addressing the question, why arrhythmic animals can be synchronized again by activity but not by light.

No day-night difference in the expression of NPY could be detected in rhythmic and arrhythmic animals due to a high variation in the signal within the two groups. Therefore, a possible role of NPY in the SCN needs to be further investigated in animals having access to a running wheel.

Key words: arrhythmia, clock genes, *Phodopus sungorus*

7 Literaturverzeichnis

- Abe, H., B. Rusak, H. A. Robertson (1991):
Photic induction of fos protein in the suprachiasmatic nucleus is inhibited by the NMDA receptor antagonist MK-801.
Neurosci. Lett. 127, 9 – 12
- Albrecht, U., Z. S. Sun, G. Eichele, C. C. Lee (1997):
A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mPer1 and mPer2, to light.
Cell 91, 1055 – 1064
- Albrecht, U., H. C. Lu, J. P. Revelli, X. C. Xu, R. Lotan, G. Eichele (1998):
Studying gene expression on tissue sections using in situ hybridisation.
in Kenneth, W., K. W. Adolph (Eds.): *Human genome Methods*.
CRC Press, Boca Raton, FL., 93 – 120
- Albrecht, U., B. Zheng, D. Larkin, Z. S. Sun, C. C. Lee (2001):
mPer1 and mPer2 are essential for normal resetting of the circadian clock.
J. Biol. Rhythms 16, 100 – 104
- Aronin, N., S. M. Sagar, F. R. Sharp, W. J. Schwartz (1990):
Light regulates expression of a fos-related protein in rat suprachiasmatic nucleus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 5959 – 5962
- Aschoff, J. (1960):
Exogenous and endogenous components in circadian rhythms.
Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 25, 11 – 28
- Aschoff, J. (1979):
Circadian rhythms: Influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions.
Z. Tierpsychol. 49, 225 – 249
- Biello, S. M. (1995):
Enhanced photic phase shifting after treatment with antiserum to neuropeptide Y.
Brain Res. 673, 25 – 29
- Biello, S. M., D. Janik, N. Mrosovsky (1994):
Neuropeptide Y and behaviorally induced phase shifts.
Neuroscience 62, 273 – 279
- Biello, S. M., D. A. Glombek, M. E. Harrington (1997):
Neuropeptide Y and glutamate block each other's phase shifts in the suprachiasmatic nucleus in vitro.
Neurosci. 77, 1049 – 1058
- Bobrzynska, K. J., N. Vrang, N. Mrosovsky (1996):
Persistence of nonphotic phase shifts in hamsters after serotonin depletion in the suprachiasmatic nucleus.
Brain Res. 741, 205 – 214

- Boer, G.J., H. A. Griffioen, H. Duindam, T. P. Van der Woude, W. J. Rietveld (1993):
Light/dark-induced effects on behavioral rhythms in suprachiasmatic nucleus-lesioned rats irrespective of the presence of functional suprachiasmatic nucleus brain implants.
J. Interdiscipl. Cycle Res. 24, 118 – 136
- Boer, G.J., K. E. van Esseveldt, B. A. M. Van der Geest, H. Duindam, W. J. Rietveld (1999) :
Vasopressin-deficient suprachiasmatic nucleus grafts re-instate circadian rhythmicity in SCN-lesioned arrhythmic rats.
Neuroscience 89, 375 – 385
- Bos, N. P. A., M. Mirmiran (1990):
Circadian rhythms in spontaneous neural discharge of the cultured suprachiasmatic nucleus.
Brain Res. 511, 158 – 162
- Bosler, O., A. Beaudet (1985):
VIP neurons as prime synaptic targets for serotonin afferents in rat suprachiasmatic nucleus: a combined radioautographic and immunocytochemical study.
J. Neurocytol. 14, 749 – 763
- Bouskila, Y., F. E. Dudek (1993):
Neuronal synchronization without calcium-dependent synaptic transmission in the hypothalamus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 3207 – 3210
- Brewer, J. M., P. C. Yannielli, M. E. Harrington (2002):
Neuropeptide Y differentially suppress per1 and per2 mRNA induced by light in the suprachiasmatic nuclei of the golden hamster.
J. Biol. Rhythms 17, 28 – 39
- Buijs, R. M., M. H. Hermes, A. Kalsbeek (1998):
The suprachiasmatic nucleus-paraventricular nucleus interaction: a bridge to the neuroendocrine and autonomic nervous system.
Prog. Brain Res. 119, 365 – 382
- Cagampang, F. R. A., S.-I. T. Inouye (1994):
Diurnal and circadian changes of serotonin in the suprachiasmatic nuclei: regulation by light and an endogenous pacemaker.
Brain Res. 639, 175 – 179
- Cahill, G. M., M. Menaker (1989):
Effects of excitatory amino acid receptor antagonists and agonists on suprachiasmatic nucleus responses to retinohypothalamic tract volleys.
Brain Res. 479, 76 – 82

- Calza, L., L. Giardino, M. Zanni, A. Velardo, P. Parchi, P. Marrama (1990):
Daily changes of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of the rat.
Regul. Pept. 27, 127 – 137
- Cloudsley-Thompson, J. L. (1960):
Adaptive functions of circadian rhythms.
Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 25, 345 – 354
- Colwell, C. S., R. G. Foster (1992):
Photic regulation of fos-like immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of the mouse.
J Comp. Neurol. 324, 135 – 142
- Colwell, C. S., C. M. Kaufman, M. Menaker (1993):
Photic induction of Fos in the hamster suprachiasmatic nucleus is inhibited by baclofen but not by diazepam or bicuculline.
Neurosci. Lett. 163, 177 – 181
- Cutrera, R. A., A. Kalsbeek, P. Pevet (1994):
Specific destruction of the serotonergic afferents to the suprachiasmatic nuclei prevents triazolam-induced phase advances of hamster activity rhythms.
Behav. Brain Res. 62, 21 – 28
- Daan, S., U. Albrecht, G. T. J. van der Horst, H. Illnerova, T. Roenneberg, T. A. Wehr, W. J. Schwartz (2001):
Assembling a clock for all seasons: Are there M and E oscillators in the genes?
J. Biol. Rhythms 16, 105 – 116
- DeCoursey, P. J. (1986):
Light-sampling behavior in photoentrainment of a rodent circadian rhythm.
J. Comp. Physiol. 159, 161 – 169
- De Jeu, M., M. Hermes, C. Pennartz (1998):
Circadian modulation of membrane properties in slices of rat suprachiasmatic nucleus.
Neuroreport 9, 3725 – 3729
- De la Iglesia, H. O., J. Meyer, A. Carpino, W. J. Schwartz (2000):
Antiphase oscillation of the left and right suprachiasmatic nuclei.
Science 290, 799 – 801
- Earnest, D. J., S. M. Digiorgio, C. D. Sladek (1991):
Effects of tetrodotoxin on the circadian pacemaker mechanism in the suprachiasmatic explants in vitro.
Brain Res. Bull. 26, 677 – 628
- Earnest, D. J., M. Iadarola, H. H. Yeh, J. A. Olschowska (1990):
Photic regulation of c-fos expression in neural components governing the entrainment of circadian rhythms.
Exp. Neurol. 109, 353 – 361

- Ebling, F. J. (1996):
The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus.
Prog. Neurobiol. 50, 109 – 132
- Edelstein, K., S. Amir (1999a):
The intergeniculate leaflet does not mediate the disruptive effects of constant light on circadian rhythms in the rat.
Neuroscience 90, 1093 – 1103
- Edelstein, K., S. Amir (1999b):
The role of the intergeniculate leaflet in entrainment of circadian rhythms to a skeleton photoperiod.
J. Neurosci. 19, 372 – 380
- Francois-Bellan, A. M., O. Bosler (1992):
Convergent serotonin and GABA innervation of VIP neurons in the suprachiasmatic nucleus demonstrated by triple labelling in the rat.
Brain Res. 595, 149 – 153
- Fukuhura, C., J. M. Brewer, J. C. Dirden, E. L. Bittman, G. Tosini, M. E. Harrington (2001):
Neuropeptide Y rapidly reduces Period 1 and Period 2 mRNA levels in the hamster suprachiasmatic nucleus.
Neurosci. Lett. 314, 119 – 122
- Gannon, R. L., M. A. Rea (1995):
Twelve-hour phase shifts of hamster circadian rhythms elicited by voluntary wheel running.
J. Biol. Rhythms 10, 196 – 210
- Garcia-Hernandez, F., R. Aguilar-Roblero, R. Drucker-Colin (1987):
Transplantation of the fetal occipital cortex to the third ventricle of SCN-lesioned rats induces a diurnal rhythm in drinking behavior.
Brain Res. 418, 193 – 197
- Gekakis, N., D. Staknis, H. B. Nguyen, F. C. Davis, L. D. Wilsbacher, D. P. King, J. S. Takahashi, C. J. Weitz (1998):
Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism.
Science 280, 1564 – 1569
- Ginty, D. D., J. M. Kornhauser, M. A. Thompson, H. Bading, K. E. Mayo, J. S. Takahashi, M. E. Greenberg (1993):
Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock.
Science 260, 238 – 241
- Goldman, B. D., J. M. Darrow (1983):
The pineal gland and mammalian photoperiodism.
Neuroendocrinology 37, 386 – 396

- Harrington, M. E. (1997):
The ventral lateral geniculate nucleus and the intergeniculate leaflet: interrelated structures in the visual and circadian systems.
Neurosci. Biobehav. Rev. 21, 705 – 727
- Harrington, M. E., B. Rusak (1988):
Ablation of the geniculo-hypothalamic tract alters circadian activity rhythms of hamster housed under constant light.
Physiol. Behav. 42, 183 – 189
- Heldmaier, G. S., Lynch, G. R. (1986):
Pineal involvement in thermoregulation and acclimatization.
In R. J. Reiter (Ed): *Pineal Research Reviews*, vol. 4
Alan R Liss, New York, 97 – 193
- Heldmaier, G., S. Steinlechner, J. Raphael, P. Vsiansky (1981):
Photoperiodic control and effect of melatonin on nonshivering thermogenesis and brown adipose tissue.
Science 212, 917 – 919
- Hoffmann, K. (1973):
The influence of photoperiod and melatonin on testis size, body weight and pelage colour in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*).
J. Comp. Physiol. A. 85, 267 – 282
- Hoorneman, E. M., R. M. Buijs (1982):
Vasopressin fiber pathways in the rat brain following suprachiasmatic nucleus lesioning.
Brain Res. 243, 235 – 241
- Hsu, D. S., X. Zhao, S. Zhao, A. Kazantsev, R.-P. Wang, T. Toda, Y.-F. Wei, A. Sancar (1996):
Putative human blue-light photoreceptors hCRY1 and hCRY2 are flavoproteins.
Biochemistry 35, 13871 – 13877
- Hsu, S. M., L. Raine, H. Fanger (1981) :
Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures.
J. Histochem. Cytochem. 29, 577 – 580
- Janik, D., N. Mrosovsky (1993):
Nonphotonically induced phase shifts of circadian rhythms in the golden hamster: activity-response curves at different ambient temperatures.
Physiol. Behav. 53, 431 – 436
- Janik, D., N. Mrosovsky (1994):
Intergeniculate leaflet lesions and behaviourally-induced shifts of circadian rhythms.
Brain Res. 651, 174 – 182

- Jolkkonen, J., L. Tuomisto, T. B. van Wimersma Greidanus, P. J. Riekkinen (1988):
Vasopressin levels in the cerebrospinal fluid of rats with lesions of the paraventricular and suprachiasmatic nuclei.
Neurosci. Lett. 86, 184 – 188
- Johnson, R. F., R. Y. Moore, L. P. Morin (1989):
Lateral geniculate lesions alter activity rhythms in the hamster.
Brain Res. Bull. 22, 411 – 422
- Kalsbeek, A., R. M. Buijs, M. Engelmann, C. T. Wotjak, R. Landgraf (1995):
In vivo measurement of a diurnal variation in vasopressin release in the rat suprachiasmatic nucleus.
Brain Res. 682, 75 – 82
- Kalsbeek, A., R. A. Cutera, J. J. van Heerikhuizen, J. van der Vliet, R.M. Buijs (1999):
GABA release from suprachiasmatic nucleus terminals is necessary for light-induced inhibition of nocturnal melatonin release in the rat.
Neuroscience 91, 453 – 461
- Kornhauser, J. M., D. E. Nelson, K. E. Mayo, J. S. Takahashi (1990):
Photic and circadian regulation of c-fos gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus.
Neuron 5, 127 – 134
- Kruisbrink, J., M. Mirmiran, T. P. van der Woude, G. J. Boer (1987):
Effects of enhanced cerebrospinal fluid levels of vasopressin, vasopressin antagonist or vasoactive intestinal polypeptide on circadian sleep-wake rhythm in the rat.
Brain Res. 419, 76 – 86
- Lehman, M. N., M. R. Ralph (1994):
Modulation and restitution of circadian rhythms.
In: S. B. Dunnett, A. Bjorklund (Eds.): Functional Neural Transplantation.
Raven Press, New York, 467-487
- Liou, S. Y., S. Shibata, K. Iwasaki, S. Ueki (1986):
Optic nerve stimulation-induced increase of release of 3H-glutamate and 3H-aspartate but not 3H-GABA from the suprachiasmatic nucleus in slice of rat hypothalamus.
Brain Res. Bull. 16, 527 – 531
- Lynch, G. R., C. B. Lynch, R. M. Kliman (1989):
Genetic analyses of photoresponsiveness in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*.
J. Comp. Physiol. A 164, 475 – 481
- Mason, R., A. Brooks (1988):
The electrophysiological effects of Melatonin and putative antagonist (N-acetyltryptamine) on rat suprachiasmatic neurones in vitro.
Neurosci. Lett. 95, 296 – 301

- Masubuchi, S., S. Homma, H. Abe, K. Ishizaki, M. Namihira, M. Ikeda, K.-I. Honma (2000):
Clock genes outside the suprachiasmatic nucleus involved in manifestation of locomotor activity in rats.
Eur. J. Neurosci. 12, 4206 – 4214
- Maywood, E. S., E. Smith, S. J. Hall, M. H. Hastings (1997):
A thalamic contribution to arousal-induced, non-photic entrainment of the circadian clock of the Syrian hamster.
Eur. J. Neurosci. 9, 1739 – 1747
- Mead, S., F. J. P. Ebling, E. S. Maywood, T. Humby, J. Herbert, M. H. Hastings (1992):
A non-photic stimulus causes instantaneous phase advances of the light-entrainable circadian oscillator of the Syrian hamster but does not induce the expression of c-fos in the suprachiasmatic nuclei.
J. Neurosci. 12, 2516 – 2522
- Moga, M. M., R. Y. Moore (1997):
Afferents to the suprachiasmatic nucleus shown by anterograde and retrograde tracing studies.
J. Comp. Neurol. 389, 508 – 534
- Moore, R. Y., V. B. Eichler (1972):
Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat.
Brain Res. 42, 201 – 206
- Moore, R. Y., N. J. Lenn (1972):
A retinohypothalamic projection in the rat.
J. Comp. Neurol. 146, 1 – 14
- Morin, L. P. (1994):
The circadian visual system.
Brain Res. Rev. 67, 102 – 127
- Penev, P. D., F. W. Turek, P. C. Zee (1995):
A serotonin neurotoxin attenuates the phase-shifting effects of triazolam on the circadian clock in hamsters.
Brain Res. 669, 207 – 216
- Penev, P. D., P. C. Zee, F. W. Turek (1994):
Monoamine depletion blocks triazolam-induced phase advances of the circadian clock in hamster.
Brain Res. 637, 255 – 261
- Pickard, G. E. (1985):
Bifurcating axons of retinal ganglion cells terminate in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet of the thalamus.
Neurosci. Lett 55, 211 – 217

- Pickard, G. E. (1994):
Intergeniculate leaflet ablation alters circadian rhythms in the mouse.
NeuroReport 5, 2186 – 2188
- Pickard, G. E., M. R. Ralph, M. Menaker (1987):
The intergeniculate leaflet partially mediates effects of light on circadian rhythms.
J. Biol. Rhythms 2, 35 – 56
- Pickard, G. E., E. T. Weber, P. A. Scott, A. F. Riberdy, M. A. Rea (1996):
5HT_{1B} receptor agonists inhibit light-induced phase shifts of behavioural circadian rhythms and expression of the immediate-early gene c-fos in the suprachiasmatic nucleus.
J. Neurosci. 16, 8208 – 8220
- Pittendrigh, C. S. (1960):
Circadian rhythms and the circadian organisation of living systems.
Cold Spring Hab. Symp. Quant. Biol. 25, 159 – 182
- Pittendrigh, C. S., S. Daan (1976a):
A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. IV. Entrainment: Pacemaker as clock.
J. Comp. Physiol. 106, 291 – 331
- Pittendrigh, C. S., S. Daan (1976b):
A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. V. Pacemaker structure: a clock for all seasons.
J. Comp. Physiol. 106, 333 – 355
- Puchalski, W., G. R. Lynch (1988):
Characterization of circadian function in Djungarian hamsters insensitive to short day photoperiod.
J. Comp. Physiol. A. 162, 309 – 316
- Ralph, M. R., R. G. Foster, F. C. Davis, M. Menaker (1990):
Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period.
Science 247, 975 – 978
- Ralph, M. R., M. Menaker (1988):
A mutation of the circadian system in golden hamsters.
Science 241, 1225 – 1227
- Rea, M. A. (1989):
Light increases fos-related protein immunoreactivity in the rat suprachiasmatic nuclei.
Brain Res. 579, 107 – 112
- Rea, M. A., B. Buckley, L. M. Lutton (1993):
Local administration of EAA antagonists blocks light-induced phase shifts and c-fos expression in hamsters SCN.
Am. J. Physiol. 265, R1191 – 1198

- Reiter, R. J. (1993):
The melatonin rhythm: both a clock and a calendar.
Experientia 49, 654 – 664
- Reppert, S. M., H. G. Artman, S. Swaminathan, D. A. Fisher (1981):
Vasopressin exhibits a rhythmic daily pattern in cerebrospinal fluid but not in blood.
Science 213, 1256 – 1257
- Rosenwasser, A. M., Z. Boulos, M. Terman (1983):
Circadian feeding and drinking rhythms in the rat under complete and skeleton photoperiods.
Physiol. Behav. 30, 353 – 359
- Ruby, N. F., A. Saran, T. Kang, P. Franken, H. C. Heller (1996):
Siberian hamsters free run or become arrhythmic after a phase delay of the photocycle.
Am. J. Physiol. 271, R881 – R 890
- Rusak, B., H. A. Robertson, W. Wisden, S. P. Hunt (1990):
Light pulses that shift rhythms induce gene expression in the suprachiasmatic nucleus.
Science 248, 1237 – 1240
- Saper, C. B., A. D. Loewy, L. W. Swanson, W. M. Cown (1976):
Direct hypothalamic-autonomic connections.
Brain Res. 79, 347 – 351
- Schwartz, W. J. (1991):
Further evaluation of the tetrodotoxin-resistant pacemaker in the suprachiasmatic nuclei.
J. Biol. Rhythms 6, 149 – 158
- Schwartz, W. J., R. J. Coleman, S. M. Reppert (1983):
A daily vasopressin rhythm in rat cerebrospinal fluid.
Brain Res. 263, 105 – 112
- Schwartz, W. J., R. A. Gross, M. T. Morton (1987):
The suprachiasmatic nuclei contain a tetrodotoxin-resistant circadian pacemaker.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1694 – 1698
- Schwartz, S. M. Reppert (1985):
Neural regulation of the circadian vasopressin rhythm in cerebrospinal fluid.
J. Neurosci. 5, 2771 – 2778
- Seckl, J. R., S. L. Lightman (1987):
Diurnal rhythm of vasopressin but not of oxytocin in the cerebrospinal fluid of the goat: lack of association with plasma cortisol rhythm.
J. Endocrinol. 114, 477 – 482

- Shearman, L. P., M. J. Zylka, D. R. Weaver, L. F. J. Kolakowski, S. M. Reppert (1997):
Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the
suprachiasmatic nuclei.
Neuron 19, 1261 – 1269
- Shearman, L. P., S. Srirani, D. R. Weaver, E. S. Maywood, I. Chaves, B. Zheng, K.
Kume, C. C. Lee, G. T. J. van der Horst, M. H. Hastings, S. M. Reppert (2000):
Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock.
Science 288, 1013 – 1019
- Sheng, M., M. E. Greenberg (1990):
The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the
nervous system.
Neuron 4, 477 – 485
- Shibata, S., V. M. Cassone, R. Y. Moore (1989):
Effects of melatonin on neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus in
vitro.
Neurosci. Lett. 97, 140 – 144
- Shibata, S., R. Y. Moore (1993):
Tetrodotoxin does not effect circadian rhythms in neuronal activity and
metabolism in rodent suprachiasmatic nucleus in vitro.
Brain Res. 606, 259 – 266
- Shinohara, K., K. Tominaga, C. Fukuhara, Y. Otori, S.-I. T. Inouye (1993a):
Processing of photic information within the intergeniculate leaflet of the lateral
geniculate body: assessed by neuropeptide Y immunoreactivity in the
suprachiasmatic nucleus of rats.
Neuroscience 56, 813 – 822
- Shinohara, K., K. Tominaga, Y. Isobe, S.-I. T. Inouye (1993b):
Photic regulation of peptides located in the ventrolateral subdivision of the
suprachiasmatic nucleus of the rat: daily variations of vasoactive intestinal
polypeptide, gastrin releasing peptide and neuropeptide Y:
J. neurosci. 13, 793 – 800
- Sokolove, P. G., W. N. Bushell (1978):
The chi square periodogram: Its utility for analysis of circadian rhythms.
J. Theor. Biol. 72, 131 – 160
- Sollars, P. J., D. P. Kimble, G. E. Pickard (1995):
Restoration of circadian behavior by anterior hypothalamic heterografts.
J. Neurosci. 15, 2109 – 2122
- Steinlechner, S. (1992):
Melatonin: An endocrine signal for the night length.
Verh. Dtsch. Zool. Ges. 85, 217 – 229

- Steinlechner, S., A. Stieglitz, T. Ruf (2002):
Djungarian Hamsters: A species with a labile circadian pacemaker? Arrhythmicity under a light-dark cycle induced by short light pulses.
J. Biol. Rhythms 17, 248 – 258
- Stephan, F. K. (1983):
Circadian rhythms in rat: constant darkness, entrainment to T cycles and to skeleton photoperiods.
Physiol. Behav. 30, 451 – 462
- Stephan, F. K., I. Zucker (1972):
Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1583 – 1586
- Stopa, E. G., J. K. Johnson, D. I. Friedman, H. I. Ryer, J. Reidy, V. K. LeBlanc, H. E. Albers (1995):
Neuropeptide Y receptor distribution and regulation in the suprachiasmatic nucleus of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*).
Peptide Res. 8, 95 – 100
- Sumova, A., F. J. P. Ebeling, E. S. Maywood, J. Herbert, M. H. Hastings (1994):
Non-photoc circadian entrainment in the Syrian hamster is not associated with phosphorylation of the transcriptional regulator CREB within the suprachiasmatic nucleus, but is associated with adrenocortical activation.
Neuroendocrinology 59, 579 – 589
- Sumova, A., E. S. Maywood, D. Selvage, F. J. P. Ebeling, M. H. Hastings (1996):
Serotonergic antagonists impair arousal-induced phase shifts of the circadian system of the Syrian hamster.
Brain Res. 709, 88 – 96
- Sun, Z. S., U. Albrecht, O. Zhuchenko, J. Bailey, G. Eichele, C. C. Lee (1997):
RIGUI, a putative mammalian ortholog of the drosophila period gene.
Cell 90, 1003 – 1011
- Swanson, L. W., W. M. Cowan, E. G. Jones (1974) :
An autoradiographic study of the efferent connections of the ventral lateral geniculate nucleus in the albino rat and cat.
J. Comp. Neurol. 156, 143 – 163
- Takumi, T., C. Matsubara, Y. Shigeyoshi, K. Yagita, Y. Meabayashi, Y. Sakakida, K. Okumura, N. Takashima, H. Okamura (1998) :
A new mammalian period gene predominantly expressed in the suprachiasmatic nucleus.
Genes Cells 3: 167 – 176
- Tei, H., H. Okamura, Y. Shigeyoshi, C. Fukuhara, R. Ozawa, M. Hirose, Y. Sakaki (1997):
Circadian oscillation of a mammalian homologue of the Drosophila period gene.
Nature 389, 512 – 516

- Treep, J. A., H. Abe, B. Rusak, D. M. Goguen (1995):
Two distinct retinal projections to the hamster suprachiasmatic nucleus.
J. Biol. Rhythms 10, 299 – 307
- Todo, T., H. Ryo, K. Yamamoto, H. Toh, T. Inui, H. Ayaki, T. Nomura, M. Ikenaga (1996):
Similarity among the *Drosophila* (6-4)photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family.
Science 272, 109 – 112
- Van der Spek, P. J., K. Kobayashi, D. Bootsma, M. Takao, A. P. M. Eker, A. Yasui (1996):
Cloning, tissue expression, and mapping of a human photolyase homolog with similarity to plant blue-light receptors.
Genomics 37, 177 – 182
- Van Reeth, O., F. W. Turek (1989):
Stimulated activity mediates phase shifts in the hamster circadian clock induced by darkpulses or benzodiazepines.
Nature 339, 49 – 51
- Vitaterna, M. H., D. P. King, A.-M. Chang, J. M. Kornhauser, P. L. Lowrey, J. D. McDonald, W. F. Dove L. H. Pinto, F. W. Turek, J. S. Takahashi (1994):
Mutagenesis and mapping of mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior.
Science 264, 719 – 725
- Watts, A. G. (1991):
The efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: anatomic insights into the control of circadian rhythms.
In: D. C. Klein, R. Y. Moore, S. M. Reppert (Eds.): *Suprachiasmatic Nucleus. The Mind's Clock*.
Oxford University Press, New York, 77 – 106
- Watts, A. G., L. W. Swanson (1987):
Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: II. Studies using anterograde transport of fluorescent dyes and simultaneous peptide immunohistochemistry in the rat.
J. Comp. Neurol. 258, 230 – 252
- Watts, A. G., L. W. Swanson, G. Sanchez-Watts (1987):
Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin in the rat.
J. Comp. Neurol. 258, 204 – 229
- Weber, E. T., M. A. Rea (1997):
Neuropeptide Y blocks light-induced phase advances but not delays of the circadian activity rhythm in hamster.
Neurosci. Lett. 231, 159 – 162

- Welsh, D. K., D. E. Logothetis, M. Meister, S. M. Reppert (1995):
Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms.
Neuron 14, 697 – 706
- Wickland, C., F. W. Turek (1994):
Lesions of the thalamic intergeniculate leaflet block activity-induced phase shifts in the circadian activity rhythm of the golden hamster.
Brain Res. 660, 293 – 300
- Wickland, C. R., F. W. Turek (1991):
Phase-shifting effects of acute increases in activity on circadian locomotor rhythms in hamsters
Am. J. Physiol. 261, R1109 – 1117
- Wollnik, F., W. Brysch, E. Uhlman, F. Gillardon, R. Bravo, M. Zimmermann, K. H. Schlingensiepen, T. Herdegen (1995):
Block of c-Fos and JunB expression by antisense oligonucleotides inhibits light-induced phase shifts of the mammalian circadian clock.
Eur. J. Neurosci. 7, 388 – 393
- Yamamoto, S., Y. Shgeyoshi, Y. Ishida, T. Fukuyama, S. Yamaguchi, K. Yagita, T. Moriya, S. Shibata, N. Takashima, H. Okamura (2001):
Expression of the *Per1* Gene in the hamster: Bain atlas and circadian characteristics in the suprachiasmatic nucleus.
J. Comp. Neurol. 430, 518 – 532
- Yannielli, P. C., M. E. Harrington (2001):
Neuropeptide Y5 receptor mediates the blockade of “photic-like” NMDA-induced phase shifts
J. Neurosci 21, 5367 – 5376
- Zhang, Y., O. van Reeth, P. C. Zee, J. S. Takahashi, F. W. Turek (1993):
Fos protein expression in the circadian clock is not associated with phase shifts induced by a nonphotic stimulus, triazolam.
Neurosci. Lett. 164, 203 – 208
- Zhdanova, I. V., H. J. Lynch, R. J. Wurtman (1997):
Melatonin: a sleep-promoting hormone.
Sleep 20, 899 – 907
- Zhdanova, I. V., R. J. Wurtman (1997):
Efficacy of melatonin as a sleep-promoting agent.
J. Biol. Rhythms 12, 644 – 650

8 Anhang

8.1 Material

8.1.1 Substanzen und Kits

Substanz	Hersteller	Artikel-Nummer
100 bp DNA LadderMarker	Gibco BRL, Manufacturer Life Technologies, Paisley, UK	15628-019
Agar	Gibco BRL, Manufacturer Life Technologies, Paisley, UK	30391-023
Agarose	Gibco BRL, Manufacturer Life Technologies, Paisley, UK	15510-027
Amonium-Nickel- Sulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	9885
Ampicillin	Applichem, Darmstadt	A0839
β -Mercaptoethanol	Sigma Chemicals Co, St.Louis, Mo., USA	M6250
D(+)-Glucose	Applichem, Darmstadt	A 3666
D-(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	4661.2
DAB, 3,3'Diaminobezidine	Sigma Chemicals Co, St.Louis, Mo., USA	D-5637
Developer D19	Kodak, Stuttgart	1464593
Dnase I	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim	776785
DPX (Einschlussmedium für die Histologie)	Fulka Chemie AG, Buchs, CH	44581
DTT 0,1 M	Gibco BRL, Manufacturer Life Technologies, Paisley, UK	Y00147
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	E-5134
EDTA-Farbstoff Blue Dextran	Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA	402055

Anhang

Substanz	Hersteller	Artikel-Nummer
Essigsäure	Merck, Darmstadt	63
Ethanol (70%, 100%)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	9065.4
Ethidiumbromid	Sigma Chemicals Co, St.Louis, Mo., USA	
Fixer (Kodak)	Sigma Chemicals Co, St.Louis, Mo., USA	P6557
Formamid	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim	100144
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	4043.1
Goat-Anti-Rabbit (Biotinylierter Antikörper IgG)	Sigma Bio Sciences, St. Louis, Mo., USA	B-7389
Goatserum	Sigma Bio Sciences, St. Louis, Mo., USA	G-9023
HCl (1N)	Merck, Darmstadt	109.057
Histoclear	Natinoal Diagnostic, Manville, NJ, USA	HS200
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	6752.2
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt	104.936
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt	5099
Methanol	Merck, Darmstadt	106.007
MgCl ₂ *6(H ₂ O)	Fulka Chemie AG, Buchs, CH	63064
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt	6346
NaCl	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	9265.2
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt	6586
NaOH (1N)	Merck, Darmstadt	9137
Natriumacetat (Trihydrat)	Sigma Chemicals Co, St.Louis, Mo., USA	S 9513
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	3957.1

Anhang

Substanz	Hersteller	Artikel-Nummer
NTB-2 Emulsion	Kodak, Stuttgart	1654433
Nucleobon [®] AX500	Machery-Nagel GmbH & CO KG, Düren	740575.50
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	16005
Pepton	Gibco BRL, Manufacturer Life Technologies, Paisley, UK	30392-021
Premix (Big Dye [™]) für die Sequenzierung	Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA	
Primer: 5'-GGG ACT CTC AGG GCA GTG ACT GTG ATG-3' 5'-TCG TTA GCC TTC ACC TGC TTC ACG CTG-3'	MWG Biotech, Ebersberg	
Protinase K	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim	745723
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN GmbH, Hilden	27106
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden	28106
Rabbit-Anti-NPY (polyclonaler Antikörper)	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln	NA 1233 (A)
Ready Flow III [™] (Medium für den Counter)	Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA., USA	586603

Substanz	Hersteller	Artikel-Nummer
Restriktionsenzyme und Puffer (Aat II, Not I, BSA, Puffer 3 und 4)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt	
RNAse A	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim	109169
RNAse Inhibitor	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim	799017
Select Yeast Extract	Gibco BRL, Manufacturer Life Technologies, Paisley, UK	30392-021
SuperScript™ II Kit	Gibco BRL, Manufacturer Life Technologies, Paisley, UK	18064-014
TEA (Triethanolamin)	Merck, Darmstadt	108.357
Topo TA Cloning Kit (pCRII-Topo-Vector)	Invitrogen Life Technologies,	K450001
Tri-Natriumcitrat (Dihydrat)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	3580.1
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	121.14g/b
Triton X-100	Sigma Chemicals Co, St.Louis, Mo., USA	X-100
tRNA aus Hefe	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim	109495
Vectastain® Elite® ABC Kit (Standart)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA., USA	PK-4000
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt	9683.1
Xylol	Merck, Darmstadt	108.681

8.1.2 Lösungen und Puffer, die nicht in Kits enthalten sind

8.1.2.1 Zu 2.2

PB (0,2 M Phosphat-Puffer):

Stammlösung A: 27,598 g NaH_2PO_4 , mit ddH₂O auf 1 L auffüllen

Stammlösung B: 35,658 g Na_2HPO_4 , mit ddH₂O auf 1 L auffüllen

1 Teil Stammlösung A und 4 Teile Stammlösung B ergeben 0,2 M PB

PBS (0,1 M Phosphat-Gepufferte-Saline):

8 g NaCl

500 ml 0,2 M PB

mit ddH₂O auf 1 L auffüllen

PFA (4%ige Paraformaldehyd-Lösung):

80 g PFA

1 l ddH₂O

0,5 ml NaOH

auf 60 °C erwärmen und rühren, bis die Lösung klar ist, dann filtrieren

0,5 ml HCl hinzufügen

1 l 0,2 M PB hinzugeben und pH-Wert überprüfen (7,4)

Cryoprotektions-Lösung:

4,28 g Saccharose

0,07 g Magnesiumchlorid (Hexahydrat)

25 ml 0,1 M PBS

ad 50 ml Glycerol (87%ig)

8.1.2.2 Zu 2.4

H₂O/DEPC (DEPC behandeltes Wasser):

Um das Wasser RNase frei zu bekommen, wurde es mit 0,05%DEPC versetzt, und über Nacht bei 37°C inkubiert. Um das DEPC zu zerstören wurde es anschließend 21 Minuten bei 121°C autoklaviert.

Luria-Bertani (LB)-Medium:

10 g NaCl
10 g Trypton
5 g Hefe-Extrakt
ad 1 l H₂O
mit NaOH pH 7 einstellen
21 Minuten bei 121°C autoclaviert

SOC:

20 g Trypton
5 g Hefe-Extrakt
0,5 g NaCl
3,6 g Glucose
ad 1 l H₂O

TAE (für Gele):

48,4 g Tris
11,4 ml Essigsäure
20 ml 0,5 M EDTA pH 8
ad 1 l H₂O

8.1.2.3 Zu 2.5

H₂O/DEPC (DEPC behandeltes Wasser):

Um das Wasser RNase frei zu bekommen, wurde es mit 0,05%DEPC versetzt, und über Nacht bei 37°C inkubiert. Um das DEPC zu zerstören wurde es anschließend 21 Minuten bei 121°C autoklaviert.

Hybridisierungsmix:

50 % deionisiertes Formamid
0,3M NaCl
20 mM Tris-HCL (pH 8)
5mM EDTA
10 % dextran Sulfat
0,02 % BSA (RNase-frei)
0,02 % polyvinylpyrolidone
0,5 mg/ml Hefe-RNA (RNase-frei)
0,1 M DTT (Dithiothreitol)

Luria-Bertani (LB)-Medium:

10 g NaCl
10 g Trypton
5 g Hefe-Extrakt
ad 1 l H₂O
mit NaOH pH 7 einstellen
21 Minuten bei 121°C autoclaviert

SOC:

20 g Trypton
5 g Hefe-Extrakt
0,5 g NaCl
3,6 g Glucose
ad 1 l H₂O

TAE (für Gele):

48,4 g Tris
11,4 ml Essigsäure
20 ml 0,5 M EDTA pH 8
ad 1 l H₂O

8.1.2.4 Zu 2.6

Hybridisierungsmix:

- 50 % deionisiertes Formamid
- 0,3M NaCl
- 20 mM Tris-HCl (pH 8)
- 5mM EDTA
- 10 % dextran Sulfat
- 0,02 % BSA (RNase-frei)
- 0,02 % polyvinylpyrrolidone
- 0,5 mg/ml Hefe-RNA (RNase-frei)
- 0,1 M DTT (Dithiothreitol)

NTE:

- 292,2 g NaCl
- 100 ml 1 M Tris HCl (pH8)
- 100 ml 0,5 M EDTA
- ad 10 l ddH₂O

PBS (phosphat-gepufferte Saline):

- 80 g NaCl
- 2 g KCl
- 14,4 g Na₂HPO₄
- 2,4 g KH₂PO₄
- pH-Wert auf 7,4 einstellen, mit ddH₂O auf 10 L auffüllen

PFA (4%ige Paraformaldehyd-Lösung):

- 80 g PFA
- 1 l ddH₂O
- 0,5 ml NaOH
- auf 60 °C erwärmen und rühren, bis die Lösung klar ist, dann filtrieren
- 0,5 ml HCl hinzufügen
- 1 l 0,2 M PB hinzugeben und pH-Wert überprüfen (7,4)

Proteinase-K-Puffer:

500 mM Tris HCl pH 8,5
50 mM EDTA
ad 10 l ddH₂O

5 x SSC:

175,3 g NaCl
88,2 g NaCitrat
ad 4 l ddH₂O

Für die anderen Konzentrationen wurde entsprechend mit ddH₂O verdünnt.

TEA (Triethanolamin):

185,65 g Triethanolamin
1 l ddH₂O

8.1.2.5 Zu 2.7

Acetat Puffer (0,1 M, pH 6):

27,7 g Natriumacetat
0,5 ml Essigsäure
ad 1 l ddH₂O

DAB-Nickel-Lösung:

100 ml 0,1 M Acetatpuffer
1 g Ammonium-Nickel-Sulfat
17,4 mg DAB (in 1 ml ddH₂O)

PB (0,2 M Phosphat-Puffer):

Stammlösung A: 27,598 g NaH₂PO₄, mit ddH₂O auf 1 L auffüllen
Stammlösung B: 35,658 g Na₂HPO₄, mit ddH₂O auf 1 L auffüllen
1 Teil Stammlösung A und 4 Teile Stammlösung B ergeben 0,2 M PB

PBS (0,1 M Phosphat-Gepufferte-Saline):

8 g NaCl

500 ml 0,2 M PB

mit ddH₂O auf 1 L auffüllen

8.1.3 Geräte

Autoklaven	Sanoclav M-MCS, Wolff Vakulab HP, MMM Münchner Medizin Mechanik
Eismaschine	Scotsman B390
Elektrophoresegerät	Power Pac 300, BioRad
Entwickler	X-omat M43 Prozessor, Kodak, Stuttgart
Fotosystem	Digitales Fotodokumentations- und Aufnahmesystem, Intas
Hand-Homogenisator	B. Braun Int. GmbH, Melsungen
Heizplatte und Magnetrührer	MR-30001K, Heidolph
Hood	Steril GARD Hood class II Type A/B3, Baker company inc.
Infrarot-Passivbewegungsmelder	Conrad Electronic (19223622), Hirschau
Inkubatoren	Kelvitron®, Heraeus Instruments, Hanau BBD 6220, Heraeus Instruments, Hanau
Makrolon-Käfige Typ II und III	EHRET GmbH & Co. KG, Emmerdingen
Mikroskop	DMR Forschungsmikroskop mit HC-Optiksystem, Leica Diavert Periplan GF, Leitz SM-Lux, Leitz
Mikrotom-Kryostat	HM 500 OM, Microm Laborgeräte GmbH, Walldorf
PCR-Maschinen	Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer T _{Gradient} Thermocycler 96, Biometra
pH-Meter	766 Calimatic, Knick
Photometer	Standard UV-Vis-System HP8453, Hewlett Packard
Rührer	Heidolph
Schlauchpumpe	Miniplus 3 Abimed, Gilson, Villiers, F

Schüttelinkubator	HT Infors Multitron, Infors AG
Sequencer	AbiPrism™377 DNA-Sequencer, Perkin Elmer, Wellesley, USA
Tischzentrifuge	Biofuge pico, Heraeus Instruments
Vakuumtrockner	Speed Vac, Concentrator 5301, Eppendorf
Vortexer	MS1 Minishaker IKA®
Waagen	AT261 Delta Range®, Mettler Toledo
Wasseraufbereitungsanlagen	Maxima ultra-pure water, Eiga Seradest Ionenaustauscher SO 2000
Wasserbäder	Labor und Analystechnik GmbH LAT Lauda ecoline RE106 E100
Zentrifugen	GS-15R Centrifuge, Beckmann Sorvall®RC 3B Plus, Kendro Laboratory Products Biofuge Primo R, Heraeus Instruments QL 3100-P, Omnilab

8.1.4 Sonstiges Material

Centrifuge Tubes 50 bzw. 15 ml	Corning® Inc, NY, USA
Deckgläschen (24X60) (H878)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Dunkelkammerlampe E27 PF7 12E, red;	Philips, Hamburg
Hyper Film MP	Amersham Pharmazia Bio Tec, Bucinghamshire, UK
Histobond Adhäsions-Objektträger	Superior, Marienfeld
Microtubes (verschiedene Größen)	Eppendorf, Hamburg

Danksagung

Prof. Dr. Stephan Steinlechner gilt mein großer Dank für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und der Möglichkeit, dass ich sie in seiner Arbeitsgruppe durchführen konnte. Er hat mich herzlich in seiner Arbeitsgruppe aufgenommen und mir die Motivation zum Durchhalten vermittelt.

Weiterhin bedanke ich mich bei:

Prof. Dr. Urs Albrecht für die Überlassung von Plasmiden mit der cDNA für *Per1* des Goldhamsters und für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe die *in situ*-Hybridisierungen und die RT-PCR durchführen zu können.

Prof. Dr. Andrew Loudon für die Überlassung von Plasmiden mit der cDNA für *Per2* des Goldhamsters.

Prof. Dr. Gregor Eichele für die Möglichkeit, an seinem Institut nach dem Weggang von Prof. Dr. Urs Albrecht weiter die *in situ*-Hybridisierungen durchführen zu dürfen.

Dr. Heike Pabst für ihre Freundschaft und ihre Mühe beim Korrekturlesen.

Frauke Perl für die schöne Zeit im gemeinsamen Arbeitszimmer und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Henrik Oster für die praktische Einführung in die Methode der *in situ*-Hybridisierung und seine nette Art, die die häufigen Wartezeiten verkürzt hat.

Haiko Dernbach für das Programmieren der verwendeten QuickBasic-Programme.

Sigrid Hilken für die hilfreiche Unterstützung bei den histologischen Arbeiten.

Marianne Brüning für die Versorgung der Tiere.

Den Mitarbeitern des Instituts für Zoologie, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und in Pausen-Gesprächen sämtliche Sorgen zerstreuten.

Den Mitarbeitern des Max Planck Instituts für experimentelle Endokrinologie, die mich sehr freundlich aufgenommen haben.

Der DFG für die Bereitstellung von Sachmitteln und die Bezahlung meiner Stelle über drei Jahre im Rahmen des SPP 1002.

Meinen Eltern, die mir immer ermöglicht haben, das zu machen, was mich interessiert.

Meiner Frau, die immer für mich da ist.

Meinen Kindern Mia und Kilian, die mir zeigten, was im Leben wirklich wichtig ist.